



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMÁCIA**

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS SECOS A
PARTIR DA BIOMASSA DA MICROALGA
HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS POR
SECAGEM EM TORRE DE ASPERSÃO
(*SPRAY-DRYING*).**

Francine Elisabeth Schütz

Florianópolis, 2014

Francine Elisabeth Schütz

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS SECOS A
PARTIR DA BIOMASSA DA MICROALGA
HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS POR
SECAGEM EM TORRE DE ASPERSÃO
(*SPRAY-DRYING*).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina em requisito à obtenção de grau de Mestre em Farmácia, Área de concentração Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Dra Elenara Lemos Senna.

Florianópolis, 2014

Dedicatória

Dedico aos meus pais que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e trabalharam muito para que eu pudesse realizá-los.

Ao meu esposo, Alberto, companheiro no amor, na vida e nos sonhos, que sempre me apoiou em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Registro meus agradecimentos a todos os que compartilharam o trilhar de mais esse caminho percorrido, contribuindo, direta ou indiretamente, para que eu realizasse essa pesquisa, auxiliando-me e dando-me forças nos momentos em que eu mais precisei.

Agradeço, especialmente, à minha família, pelo apoio incondicional para que eu concretizasse este trabalho: minha mãe, Anete, e meu pai, Sérgio, que foram incansáveis em me incentivar, e sempre estiveram prontos a ajudar em tudo o que fosse necessário. À minha irmã, Stephanie, pelo apoio e ombro amigo. À minha sogra, Graça, e meu sogro, Carlos, por todas as palavras de incentivo e apoio. E em especial, ao meu esposo, Alberto, entendendo-me nos momentos de ausência, dando-me carinho e apoio. Essa dissertação também é sua.

À minha orientadora, Dra Elenara Lemos Senna, por aceitar a orientação deste trabalho e conduzir seu desenvolvimento com sabedoria e paciência. Aos colegas e professores do mestrado, por tudo o que com eles aprendi e por partilharem a construção do meu estudo.

Às amigas do coração Gecioni, Letícia, Thaísa e Janaína pelo carinho e parceria que se enraizou no decorrer desses anos.

Pelo apoio na execução dos experimentos, discutindo a metodologia de trabalho, estando sempre prontas a me ajudar nas dúvidas e, acima de tudo, pelo convívio dia a dia.

Ao professor Roberto Drener, pela disponibilização da biomassa. Sem seu conhecimento e dedicação esse trabalho não poderia ser realizado.

Ao professor Marcelo Maraschin, por todo suporte no tema de carotenoides, pela dedicação e incentivo.

Ao professor Pedro Barreto, pela colaboração nos ensaios de secagem e pela disponibilização do equipamento.

À Fernanda Ramlov, pela dedicação incansável no desenvolvimento dos experimentos no HPLC.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

“Todas as vitórias ocultam
uma abdicação”.

(Simone de Beauvoir)

RESUMO

A microalga *Haematococcus pluvialis* é conhecida por sintetizar e acumular grandes quantidades do cetocarotenoide astaxantina, sob condições ambientais extremas como alta intensidade de luz ou condições oligotróficas. Esta microalga apresenta grande interesse comercial e para uso farmacêutico é conveniente a obtenção de matérias-primas com características que permitam a sua transformação em formas farmacêuticas, incluindo a padronização em termos de concentração de constituintes ativos e elevada estabilidade química, físico-química e microbiológica. Neste caso, a secagem tem como objetivo a retirada de água, que é responsável por propiciar um meio reacional favorável às reações químicas, fenômenos físicos e proliferação microbiana. Em especial, a secagem em torre de aspersão parece ser vantajosa, pois além de permitir a obtenção de produtos secos, é uma técnica rápida, pouco agressiva ao produto, de baixo custo e elevado rendimento, além de possibilitar o controle da uniformidade e tamanho de partícula e gerar produtos intermediários com propriedades tecnológicas adequadas para a produção de medicamento. Neste trabalho os extratos secos de *Haematococcus pluvialis* foram obtidos através da técnica de secagem em torre de aspersão (*spray dryer*). Os fatores estudados foram: temperaturas de entrada (150° e 175°C) e concentrações do adjuvante de secagem Aerosil® (2, 4 e 6%) a fim de produzir extratos com melhores características tecnológicas. Os extratos obtidos apresentaram-se na forma de pó vermelho e fino, com teor de carotenoides totais variando entre 0,73 e 2,27 g/100g e teor de astaxantina entre 24,94 e 76,60 mg/100 g. O rendimento da operação de secagem variou entre 87,8 e 94,6% e o teor de umidade entre 1,0 e 1,8%. O diâmetro geométrico médio das partículas variou entre 13,41 a 14,84 µm. As densidades aparente e compactada exibiram valores bastante reduzidos, abaixo de 0,12 g/ml, e o fluxo dos pós foi caracterizado como sendo bom a excelente, conforme índice de

Carr. A microscopia eletrônica de varredura evidenciou partículas esféricas e de superfície lisa. A análise térmica dos extratos secos não apresentou eventos térmicos, sugerindo que os compostos não encontram-se na forma cristalina. O perfil de liberação dos carotenoides totais a partir dos extratos secos foi rápido, sendo o percentual dissolvido acumulado após 20 minutos de ensaio variou entre 82,6 e 89,2%. . Os valores de atividade antioxidante (DPPH) encontrados nos extratos secos variaram entre 55,78 e 77,83%, sendo que os menores valores encontrados foram obtidos para os extratos secos preparados com temperatura de entrada de 175° C, estando provavelmente relacionado com a redução da quantidade de carotenoides com o processo de secagem. O conjunto de resultados demonstrou que a obtenção dos extratos secos de *H. pluvialis* obtidos pela técnica secagem em torre de aspersão é promissora.

Palavras-chave: *Haematococcus pluvialis*, astaxantina, *spray dryer*.

ABSTRACT

Title: Obtain to dried extracts from *Haematococcus pluvialis* biomass by spray drying.

Haematococcus pluvialis is believed to accumulate highest levels of ketocarotenoid astaxanthin under extreme environmental conditions such as high light intensity or oligotrophic conditions. This microalgae has great commercial interest for pharmaceutical use is convenient to obtain raw materials with features that allow its transformation into dosage forms, including standardization in terms of concentration of active ingredients and high chemical stability, physical-chemical and microbiological. In this case, drying aims to removal of water, which is responsible for providing a favorable reaction medium for chemical reactions, physical phenomena and microbial proliferation. In particular, spray drying tower appears to be advantageous, because besides allowing to obtain dried products is a fast technique, little aggressive to the product, low cost and high performance, as well as help control the uniformity and size particle and generate intermediates with appropriate technological properties for drug production. In this work the dry extracts of *Haematococcus pluvialis* were obtained through a spray-dryer. In order to produce extracts with the best technological features, the studied factors were inlet temperatures (150° and 175°), and drying adjuvant concentrations Aerosil® (2, 4 and 6%). The obtained extracts resulted in a red and thin powder containing total carotenoids varying between 0.73 and 2.27 g/100 g, and astaxanthin content between 24.94 and 76.60 mg/100 g. The efficiency of drying production varied from 87.8 to 94.6% and the humidity content from 1.0 to 1.8%. The mean geometric diameter of the particles ranged from 13.41 and 14.84 µm. Bulk and tapped densities were lower than 0.12 g/ml, and the powders were classified as good or excellent according to Carr's index. The SEM micrographs showed

spherical particles with smooth surface. The thermal analysis of the dry extracts did not show thermal events suggesting that the compounds are not in the crystalline form. The release profile of the total carotenoids from the dried extracts was fast: the dissolved cumulative percentage after 20 minutes of the test varied between 82.6 and 89.2%. The antioxidant activity values found in the dry extracts lay between 66.78 and 77.83%, when the lowest found values were obtained for the dry extracts prepared with an inlet temperature of 175° C, which was probably associated with the carotenoids quantity reduction during the drying process. The collection of results showed that the dry extract of *H. pluvialis* obtained by the spray drying technique is promising.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, astaxanthin, spray dryer.

LISTA DE FIGURAS

Figura1. Microalga <i>Haematococcus pluvialis</i> . (a) Células em estado vegetativo e (b) células com acúmulo de astaxantina.	36
Figura 2. Estrutura química básica dos carotenoides.....	38
Figura 3. Três possíveis reações dos carotenoides e radicais livres	40
Figura 4. Estrutura química da astaxantina	51
Figura 5. Alinhamento transmembranar da astaxantina.....	52
Figura 6. Mecanismos de atividade antitumoral da astaxantina	56
Figura 7. Vias de sinalização intracelular que levma a aumento induzido por UVB de PGE2/IL-8 e inibição da secreção local pela astaxantina no tratamento pós-irradiação	60
Figura 8. Esquema de um <i>spray dryer</i> e do fluxo de secagem	68
Figura 9. Perfil de distribuição granulométrica da biomassa de <i>H. pluvialis</i>	105
Figura 10: Fotomicrografias da biomassa de <i>H. pluvialis</i> obtidas por microscopia eletrônica de varredura	106
Figura 11. Espectro de absorção da astaxantina padrão.....	109
Figura 12. Espectro de varredura da SEHP	109
Figura 13. Cromatograma obtidos nas análises de astaxantina na SEHP por CLAE.....	111
Figura 14. Fotomicrografia do dióxido de silício coloidal obtida por microscopia eletrônica de varredura	114
Figura 15. Gráfico de distribuição de tamanho das partículas dos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	119
Figura 16. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos extratos secos <i>Haematococcus pluvialis</i>	123

Figura 17. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos extratos secos <i>Haematococcus pluvialis</i>	124
Figura 18. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier da astaxantina padrão, dióxido de silício coloidal e dos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	129
Figura 19. Curvas de DSC obtidas para o dióxido de silício e para os extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	130
Figura 20. Curvas obtidas na análise termogravimétrica do (a) dióxido de silício coloidal e (b-g) e dos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	131
Figura 21. Cromatogramas obtidos após análise do extrato seco de <i>H. pluvialis</i> (ES1) por CLAE.....	134
Figura 22. Perfis de dissolução de carotenoides totais a partir dos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	138

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de secagem utilizadas para obtenção dos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	86
Tabela 2. Relação entre fluidez e índice de Carr.	92
Tabela 3. Resultados obtidos na caracterização de teor de umidade e tamanho da biomassa de <i>H. pluvialis</i>	103
Tabela 4. Resultados obtidos na caracterização da solução extrativa (SEHP).....	107
Tabela 5. Resultados obtidos na caracterização do dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200).....	114
Tabela 6. Resultados de rendimento e teor de umidade dos extratos secos em função das condições de secagem	116
Tabela 7. Tamanho de partícula e distribuição granulométrica dos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	120
Tabela 8. Valores de densidade aparente e de compactação dos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	126
Tabela 9. Valores de índice de Carr e fator de Hausner, e classificação da fluidez dos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	127
Tabela 10. Teor de carotenoides totais nos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	132
Tabela 11. Teor de astaxantina nos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	135
Tabela 12. Percentual de atividade antioxidante da biomassa de <i>H. pluvialis</i> , da solução extrativa e dos extratos secos de <i>H. pluvialis</i>	141

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Span	50
Equação 2. Determinação do resíduo seco	51
Equação 3. Teor de carotenoides totais	52
Equação 4. Densidade aparente	56
Equação 5. Densidade compactada	56
Equação 6. Índice de Carr	56
Equação 7. Fator de Hausner	57
Equação 8. Determinação de carotenoides totais dos extratos secos	58
Equação 9. Eficiência de dissolução	59
Equação 10. Atividade antioxidante	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
ANOVA	Análise da variância
COX-2	Ciclo-oxigenase
CT	Carotenoides totais
DA	Doença de Alzheimer
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
FT-IR	Infravermelho com transformada de
Fourier	
FH	Fator de Hausner
GAP	<i>Gap junction communication</i>
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
HO-1	Enzima heme oxygenase-1
IL8	Interleucina 8
iNOS	Nítrico-sintase induzida
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
IC	Índice de Carr
MSH	Hormônio estimulante de melanócito
NF-Kb	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
-OH	Hidroxila
PGE ₂	Prostaglandina
ROO*	Radical peroxil
rpm	Rotações por minuto
SEHP	Solução extrativa <i>H. pluvialis</i>
TG	Termogravimetria
TNF α	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
UVB	Ultravioleta B
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
3.1 MICROALGAS	32
3.2. <i>HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS</i>	35
3.3. CAROTENOIDES	37
3.3.1 Propriedades e funções dos carotenoides	39
3.4. ASTAXANTINA	49
3.4.1 Características estruturais	49
3.4.2 Propriedades farmacocinéticas	52
3.4.3 Toxicidade	54
.4.4 Propriedades biológicas	55
3.4.4.1 Câncer	56
3.4.4.2 Doenças inflamatórias	58
3.4.4.3 Doenças cardiovasculares	61
3.4.4.4 Efeito antidiabético	63
3.4.4.5 Efeitos fotoprotetores e dermocosméticos	64
3.5 SECAGEM POR ASPERSÃO (SPRAY-DRYING)	66
4. MATERIAIS E MÉTODOS	76
4.1 MATERIAIS	76
4.1.1 Matérias-primas e reagentes	76

4.1.2 Solventes	76
4.1.3 Equipamentos	77
4.2 MÉTODOS	78
4.2.1 Caracterização da Biomassa de <i>H. pluvialis</i>	78
4.2.1.1 Determinação da perda por dessecação	78
4.2.1.2 Determinação do tamanho e distribuição granulométrica	79
4.2.1.3 Avaliação da morfologia	80
4.2.2 Preparação e Caracterização da Solução Extrativa de <i>Haematococcus pluvialis</i>	80
4.2.2.1 Preparação da solução extrativa	81
4.2.2.2. Caracterização da solução extrativa de <i>H. pluvialis</i>	81
4.2.2.2.1 Determinação do resíduo seco	81
4.2.2.2.2 Determinação do pH	82
4.2.2.2.3 Determinação da densidade relativa	83
4.2.2.2.4 Determinação de carotenoides totais	83
4.2.2.2.5 Determinação do teor de astaxantina na solução extrativa	84
4.2.3 Preparação e Caracterização dos Extratos Secos de <i>Haematococcus pluvialis</i> por Aspersão em Torre de Secagem (<i>Spray-Drying</i>).	85
4.2.3.1 Preparação dos Extratos Secos	85
4.2.3.2.1 Determinação da perda por dessecação	87
4.2.3.2.2 Determinação do pH	87
4.2.3.2.3 Determinação tamanho e distribuição granulométrica	88
4.2.3.2.4 Avaliação da morfologia	88
4.2.3.3 Caracterização dos extratos secos	89

4.2.3.3.1 Rendimento	89
4.2.3.3.2 Teor de umidade residual	89
4.2.3.3.3 Análise granulométrica	89
4.2.3.3.4 Avaliação da morfologia das partículas	90
4.2.3.3.5 Determinação da densidade aparente e compactação	91
4.2.3.3.6 Avaliação das propriedades de fluxo dos extratos secos	91
4.2.3.3.7 Espectroscopia de absorção no infravermelho	93
4.2.3.3.8 Análise térmica	94
4.2.3.3.9 Determinação de carotenoides totais	94
4.2.3.3.10 Determinação da astaxantina por CLAE	95
4.2.3.3.12 Avaliação do perfil de dissolução dos carotenoides totais a partir dos extratos secos	96
4.2.4 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> da biomassa, SEHP e dos ES pelo método do DPPH	98
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	101
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE <i>H. PLUVIALIS</i>	103
5.2 CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA	106
5.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SECOS DE <i>H. PLUVIALIS</i>	111
5.3.1 Caracterização do adjuvante dióxido de silício coloidal	112
5.3.2 Preparação e caracterização dos extratos secos	115
5.3.2.1 Avaliação dos parâmetros de secagem sobre as características químicas e físico-químicas dos ES	115
5.3.2.1.1 Rendimento e teor de umidade	115
5.3.2.1.2 Tamanho de partícula	118

5.3.2.1.3 Avaliação da morfologia	121
5.3.2.1.4 Determinação da densidade aparente e de compactação	125
5.3.2.1.5 Avaliação das propriedades de fluxo	126
5.3.2.1.6 Espectroscopia de absorção no infravermelho	128
5.3.2.1.7 Análise calorimétrica exploratória diferencial e termogravimétrica (TG)	129
5.3.2.1.8 Teor de carotenoides totais	131
5.3.2.1.9 Teor de astaxantina	134
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA BIOMASSA, SOLUÇÃO EXTRATIVA E DOS EXTRATOS SECOS DE <i>HAEMATOCOCCUS PULVIALIS</i>	140
6. CONCLUSÕES	145
7. REFERENCIAS	153

1. INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

As microalgas são organismos unicelulares dotados de clorofila e outros pigmentos, constituindo um dos mais eficientes sistemas biológicos de transformação da energia solar em compostos orgânicos, através da fotossíntese. Semelhantemente ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta. Os três principais pigmentos encontrados nas microalgas são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (ABALDE et al., 1995).

Os carotenoides são pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza, cuja coloração varia do amarelo ao vermelho intenso (STAHL, SIES, 2003). Seu potencial biológico está fortemente relacionado a sua atividade antioxidante, pois têm a capacidade de agir no sequestro de radicais livres e inativação dos mesmos (PALOZZA, KRINSKY, 1992). Os carotenoides exercem, portanto, um importante papel em doenças relacionadas ao envelhecimento, estando implicados na prevenção de várias patologias, como o câncer, aterosclerose, catarata, problemas cardiovasculares, artrite reumatoide, entre outras. Além dos efeitos antioxidantes, estudos têm mostrado que os carotenoides

podem atuar na regulação do crescimento celular, modulação da expressão gênica e resposta imune (STAHL, SIES, 2003). Os carotenoides são inibidores naturais da sinalização do NF- κ B, exibindo, assim, importante atividade anti-inflamatória (JIN et al., 2006).

Haematococcus pluvialis é uma alga verde pertencente à divisão *Chlorophyta*, classe *Chlorophyceae*, ordem *Volvocales* e família *Haematococcaceae*. É conhecida por sintetizar e acumular grandes quantidades do cetocarotenoide astaxantina (3,39-dihidroxi-b,b-caroteno-4,49-diona), sob condições ambientais extremas como alta intensidade de luz ou condições oligotróficas (OKADA, ISHIKURA, MAOKA, 2009). Autores relatam que a configuração química diferenciada da astaxantina seria a responsável pela sua maior capacidade antioxidante, quando comparada aos demais carotenoides e a algumas vitaminas (MIKI, 1991; NAGUIB, 2000). Ainda, devido à sua estrutura lipofílica, exerce propriedades antioxidantes em membranas celulares (KURASHIGE et al., 1990; IWAMOTO et al., 2000), principalmente na captura de agentes oxidantes que possam causar danos em biomoléculas. Estas características fazem com que a astaxantina exiba diversos efeitos biológicos na prevenção e/ou tratamento de doenças como diabetes (MANABE et al., 2008), câncer (ZHANG et al., 2014), doenças inflamatórias (LEE et al., 2003; YASUI et al.,

2011), e doenças cardiovasculares (HUSSEIN et al., 2006a, PASHKOW et al., 2008). Estudos mais recentes também têm evidenciado que a astaxantina exibe atividade fotoprotetora frente aos efeitos deletérios da radiação solar (TOMINAGA et al., 2012; YOSHIBA et al., 2014).

Em função disto, a *Haematococcus pluviialis* é uma microalga que apresenta grande interesse para o setor farmacêutico e cosmético, devido a sua capacidade de produzir elevadas quantidades de carotenoides, em especial a astaxantina. Entretanto, para uso farmacêutico é conveniente a obtenção de matérias-primas com características que permitam a sua transformação em formas farmacêuticas, incluindo a padronização em termos de concentração de constituintes ativos e elevada estabilidade química, físico-química e microbiológica. Neste caso, a secagem tem como objetivo a retirada de água, que é responsável por propiciar um meio reacional favorável às reações químicas, fenômenos físicos e proliferação microbiana. Em especial, a secagem em torre de aspersão parece ser vantajosa, pois além de permitir a obtenção de produtos secos, é uma técnica rápida, pouco agressiva ao produto, de baixo custo e elevado rendimento, além de possibilitar o controle da uniformidade e tamanho de partícula e gerar produtos intermediários com propriedades tecnológicas

adequadas para a produção de medicamentos (OLIVEIRA, PETROVICK, 2010).

Estudos demonstraram que a secagem em torre de aspersão pode ser empregada na obtenção da biomassa de *H. pluvialis*, sem uma degradação excessiva dos carotenoides (LEACH et al., 1998; CERÓN-GARCÍA et al., 2010; RYCKEBOSCH et al., 2011; RAPOSO et al., 2012). Entretanto, estudos para obtenção de extratos secos ricos em carotenoides de *H. pluvialis* não são descritos na literatura. Por outro lado, para o processo de secagem é necessária a seleção do tipo e concentração de adjuvantes, visto que estes determinam não somente o rendimento do processo, mas também as propriedades químicas e físico-químicas do produto final, que podem afetar inclusive as características de biodisponibilidade dos constituintes ativos. Assim, este trabalho tem como objetivo preparar e caracterizar extratos secos de *H. pluvialis* pela técnica de secagem em torre de aspersão. O efeito do emprego de adjuvantes farmacêuticos e dos parâmetros de secagem sobre as características finais dos extratos secos será avaliado neste trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver extratos secos de *Haematococcus pluvialis* pela técnica de secagem em torre de aspersão.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar soluções extrativas a partir da biomassa de *H. pluvialis* e caracterizá-las quanto às propriedades químicas e físico-químicas, em especial quanto ao teor de carotenoides totais e astaxantina.
- À partir das soluções extrativas, preparar extratos secos de *Haematococcus pluvialis* pela técnica de secagem em torre de aspersão (*spray-drying*).
- Caracterizar os extratos secos quanto à morfologia das partículas, teor de umidade, rendimento, teor de carotenoides totais e astaxantina, tamanho e distribuição granulométrica das partículas, densidade e propriedades de fluxo.
- Avaliar estatisticamente o efeito da adição de adjuvantes e das condições de secagem sobre as características químicas e físico-químicas dos extratos secos.

- Avaliar o perfil de dissolução dos carotenoides a partir dos extratos secos.
- Avaliar a atividade antioxidante da solução extrativa e dos extratos secos de *H. pluvialis* pelo ensaio do DPPH.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 MICROALGAS

As microalgas constituem um grupo extremamente heterogêneo de organismos unicelulares dotados de clorofila e outros pigmentos, sendo um dos mais eficientes sistemas biológicos de transformação da energia solar em compostos orgânicos, realizados por meio da fotossíntese (OLAIZOLA, 2003). Apresentam uma distribuição global, podendo ser cultivadas nos mais inóspitos locais, tais como lagos salinos adjacentes a desertos ou nos mares Ártico e Antártico. São classificadas quanto ao tipo de pigmento, natureza química dos produtos de reserva e quanto aos constituintes de sua parede celular (DERNER, 2006).

A grande diversidade de microalgas e suas características fisiológicas torna este grupo uma fonte potencialmente rica de compostos químicos, com aplicação nas indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêutica. Como qualquer outro micro-organismo, as microalgas reagem a variações do meio externo com consequentes alterações do seu ambiente intracelular (HENRIQUES et al., 1998). Assim, a manipulação de condições de cultivo, notadamente a presença ou ausência

de determinados nutrientes, estimula a biossíntese de compostos, incluindo aqueles com atividade biológica (HENRIQUES et al., 1998; OLAIZOLA, 2003). Portanto, em decorrência da elevada importância econômica, nutricional e ecológica, as microalgas têm sido foco de inúmeras investigações (PRIYADARSHANI, RATH, 2012). Microalgas podem ser utilizadas para obtenção de uma grande variedade de metabólitos, tais como proteínas, lipídios, carboidratos, carotenoides e vitaminas, os quais podem ser aplicados como aditivos alimentares, cosméticos e para a produção de energia. Além disso, microalgas podem ser empregadas como um meio de sequestrar o dióxido de carbono a partir de gases poluentes emitidos por indústrias, e na purificação de efluentes e produção de biocombustíveis (LORENZ e CYSEWSKI, 2000; DONG e ZHAO, 2004).

Segundo Van de Hoek e colaboradores (1995) as microalgas podem apresentar dois tipos de estrutura celular: (i) estrutura procariótica, com representantes nas Divisões *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta*; e (ii) estrutura celular eucariótica, com representantes nas divisões *Chlorophyta*, *Euglenophyta*, *Rhodophyta*, *Haptophyta* (*Prymnesiophyta*), *Heterokontophyta*, *Cryptophyta* e *Dinophyta*. O número exato de espécies microalgais ainda é desconhecido, porém, há relatos de que possam existir de

200.000 até alguns milhões de representantes deste grupo (apud DERNER, 2006). Semelhantemente ao que ocorre em outros organismos, cada classe de microalgas apresenta sua própria combinação de pigmentos e, conseqüentemente, coloração distinta. Os três principais grupos de pigmentos encontrados na biomassa microalgal são as clorofilas, os carotenoides e as ficobilinas (ficobiliproteínas) (ABALDE et al., 1995).

O cultivo de microalgas é praticado há quase 140 anos, porém, nas últimas décadas, com o avanço e aprimoramento de tecnologias e ciências como fisiologia, microbiologia e as engenharias, houve um avanço considerável na compreensão do potencial biotecnológico destes micro-organismos. No ambiente natural, assim como nos cultivos, o crescimento de uma população microalgal é resultado da interação entre fatores biológicos, tais como as taxas metabólicas da espécie cultivada e a possível influência de outros organismos sobre o desenvolvimento algal, e fatores físico-químicos, como iluminação, temperatura, salinidade e disponibilidade de nutrientes (YONGMANITCHAI, WARD, 1991). Segundo Borowitzka (1993), é possível incrementar a síntese destes compostos através da manipulação das condições de cultivo, usualmente por algum estresse ambiental.

3.2. *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

A *Haematococcus pluvialis* é uma microalga verde pertencente à Divisão *Chlorophyta*, Classe *Chlorophyceae*, Ordem *Volvocales*, e família *Haematococcaceae*. É biflagelada e móvel (no estado vegetativo), unicelular e fotossintética (Figura 1a). É conhecida por ser a maior produtora de astaxantina, um carotenoide de grande interesse comercial, quando submetida em condições de estresse (VAN DEN HOEK et al., 1995). Em condições ótimas, as células apresentam forma esférica a elipsoidal contida por uma parede celular. Conforme as condições ambientais, as células flageladas cessam o seu movimento e gradualmente se transformam em células císticas, os aplanósporos, desenvolvendo uma coloração vermelha devido ao acúmulo de astaxantina (Figura 1b). Os aplanósporos surgem como forma de repouso ou resistência da espécie a condições desfavoráveis, tais como deficiência de nutrientes, excesso ou falta de luz, temperaturas inadequadas e presença de substâncias que interferem no seu metabolismo (MARGALITH, 1999). A *H. pluvialis* tem a capacidade de sintetizar e acumular mais de 1% do seu peso seco em astaxantina no citoplasma, quando na forma encistada (CORDEIRO et al., 1996). A produção comercial da *H. pluvialis* compreende duas etapas: a obtenção

massiva de biomassa (forma vegetativa) e a carotenogênese (forma encistada) (DONG e ZHAO, 2004; GHIGGI, 2007). Além de carotenoides, a *H. pluvialis* contém ácidos graxos, proteínas, carboidratos e minerais em sua estrutura (IMAMOGLU et al., 2007).

A partir da década de 1990 foi iniciado o cultivo desta microalga em grande escala, estando entre os maiores consumidores a indústria de produção de ração para salmão. Porém, também tem-se utilizado esta microalga na forma de cápsulas, no mercado de alimentos nutracêuticos. Seu valor atinge uma média de US\$ 3.000 /Kg (LOURENÇO, 2006).

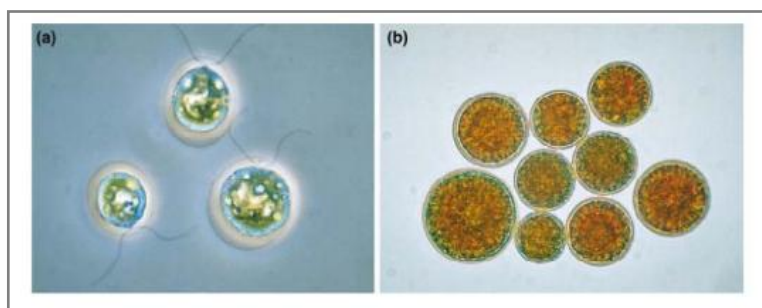


Figura 1. Microalga *Haematococcus pluvialis*. (a) Células em estado vegetativo e (b) células com acúmulo de astaxantina (Fonte: LORENZ e CYSEWSKI, 2000).

3.3. CAROTENOIDES

O termo carotenoides refere-se a uma classe de pigmentos naturais, de coloração amarela a vermelha, amplamente distribuídos nos reinos animal e vegetal, com mais de 600 variantes estruturais desta família de pigmentos relatados e caracterizados (KRINSKY, JOHNSON, 2005). Os carotenoides são compostos isoprenoides biosintetizados por meio da ligação de duas moléculas de difosfato de geranil geranila C₂₀, levando à formação da estrutura básica de 40 carbonos na qual todas as variações são derivadas. Esta estrutura básica pode ser ilustrada pelas moléculas do licopeno e β,β -caroteno (Figura 2). Este esqueleto básico pode ser modificado por meio de reações de desidrogenação, ciclização, hidrogenação, migração de dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, isomerização, rearranjo, oxidação e introdução de outros constituintes (STAHL, SIES, 2005; GUEDES, AMARO, MALCATA, 2011).

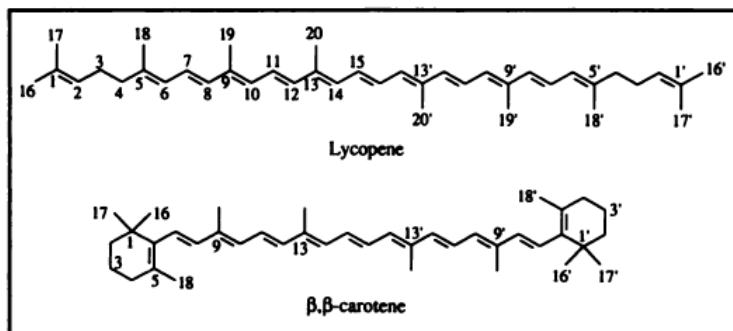


Figura 2. Estrutura química dos carotenoides (BRITTON, 1995).

Os carotenoides são divididos em duas classes principais, os carotenos e as xantofilas. Os primeiros são hidrocarbonetos poliênicos cíclicos ou lineares, enquanto as xantofilas são carotenos com pelo menos um átomo de oxigênio funcional (como $-\text{OH}$ e $=\text{O}$) em sua molécula e representam a grande maioria dos carotenoides (GONZALEZ, 2000; DEL VALLE et al., 2006). Em decorrência da presença das insaturações, os carotenoides são sensíveis à luz, temperatura, acidez, bem como a reações de oxidação. O sistema de duplas ligações conjugadas serve como cromóforo, ou seja, confere a habilidade de absorver luz na região do visível. São necessárias, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenoide apresente coloração. Logo, o espectro de absorção dos carotenoides depende do número de duplas ligações conjugadas em sua molécula. Assim, quanto mais

longo o cromóforo, maiores são os comprimentos de onda de absorção máxima, os quais variam na faixa de 410 a 510 nm (CADENAS e PACKER, 2002). O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo facilmente ser isomerados ou oxidados (DEL VALLE et al., 2006). Como regra geral, os carotenoides são lipossolúveis (HUI et al., 2005; AMBRÓSIO et al., 2006).

3.3.1 Propriedades e funções dos carotenoides

As funções naturais e ações dos carotenoides são determinadas pelas suas propriedades físicas e químicas, as quais são definidas pelas suas respectivas estruturas moleculares. Primeiramente, a geometria da molécula incluindo tamanho, forma e presença de grupos funcionais, é vital para que os carotenoides alcancem as estruturas celulares e subcelulares no local e na orientação corretos para produzir um dado efeito de forma eficiente. Segundo, o sistema de ligações duplas conjugadas determina as propriedades químicas e fotoquímicas que forma a base destas funções. Finalmente, interações específicas com outras moléculas presentes nas suas proximidades são cruciais para exercer a sua função biológica.

Os carotenoides apresentam atividade antioxidante, pois reagem com o oxigênio, protegendo as células de danos oxidativos provocados por espécies reativas de oxigênio que podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana, e atacam lipídeos, carboidratos, proteínas e DNA (HAEGELE et al., 2000). A proteção antioxidante é fornecida pelos carotenoides acíclicos, que possuem mais de nove ligações duplas conjugadas. Esses carotenoides são capazes de sequestrar espécies reativas de oxigênio, como o radical peroxil (ROO^*) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), estabilizando o elétron desemparelhado do radical por ressonância (FONTANA et al., 2000). Há três possíveis mecanismos de reação dos carotenoides, incluindo: (1) adição de espécies radicalares, (2) transferência de elétrons e (3) remoção de íons hidrogênio (Figura 3).

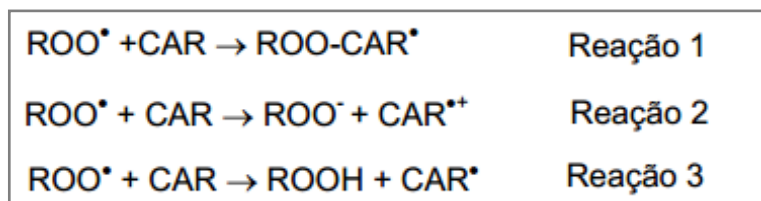


Figura 3. Três possíveis reações dos carotenoides e radicais livres. Legenda: ROO^* radical; CAR carotenoide (Fonte: adaptado de KRINSKY, JOHNSON, 2005).

Entre as funções biológicas, os carotenoides exercem um importante papel em doenças relacionadas ao envelhecimento, devido ao envolvimento no complexo sistema antioxidante que atua dentro das células. Além disso, têm sido implicados na prevenção de sérias patologias como o câncer, arteriosclerose, catarata, problemas cardiovasculares, artrite reumatoide, distrofias musculares e algumas desordens neurológicas (BRITTON, 1995; STAHL, SIES, 2005; GUEDES, AMARO, MALCATA, 2011).

Além dos efeitos antioxidantes, estudos revelaram que esses compostos podem atuar também através de outros mecanismos na regulação do crescimento celular, modulação da expressão gênica e resposta imune (STAHL, SIES, 2003). Os carotenoides são inibidores naturais da sinalização do NF- κ B, exibindo assim atividade anti-inflamatória. Foi relatado, por exemplo, que a luteína apresenta propriedades anti-inflamatórias contra uveíte induzida por endotoxina (EIU), pela inibição da degradação do I κ B- α bem como a subsequente produção de mediadores de pró-inflamatórios como NO, TNF- α , IL-6, PGE₂, MCP-1 e MCP-2 (JIN et al., 2006). Em estudos *in vitro* e *in vivo*, a luteína mostrou ser capaz de suprimir a degradação do I κ B- α e a translocação do NF- κ B p65, sugerindo efeito positivo no controle da neovascularização da coróide, uma manifestação comum na degeneração macular

relacionada à idade (IZUMI-NAGAI, et al., 2007). Li e colaboradores (2012) mostraram que a luteína protege a retina do dano hipóxico/isquêmico, devido as suas propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptótica e anti-oxidante.

A fucoxantina igualmente inibiu a ativação do NF- κ B pela supressão da degradação do I κ B- α e translocação das proteínas p50 e p65, em macrófagos RAW264.7 estimulados por lipopolissacarídeo. A fosforilação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) também foi inibida de modo dose-dependente pela fucoxantina (KIM, HEO, YOON, KANG, AHN, YI, JEON, 2010). O β -caroteno mostrou ser capaz de bloquear a translocação nuclear da subunidade da proteína p65 do NF- κ B e de inibir a fosforilação e a degradação do I κ B- α , inibindo citocinas inflamatórias *in vivo* e *in vitro* (BAI et al., 2005). A violaxantina, extraída da microalga *Chlorella ellipsoidea*, demonstrou atividade anti-inflamatória baseada na supressão das vias de NF- κ B e MAPK, evidenciando o seu grande potencial no tratamento de doenças inflamatórias (SOONTORNCHAIBOON, JOO, KIM, 2012). A aloxantina e a diatoxantina demonstraram notável capacidade de suprimir a superexpressão de COX-2 e iNOS em macrófagos RAW264.7 estimulados por lipopolissacarídeo (KONISHI et al., 2008). A administração oral de zeaxantina foi eficaz no tratamento de resposta inflamatória aguda induzida

por irradiação ultravioleta B (GONZÁLEZ, ASTNER, AN, GOUKASSIAN, PATHAK, 2003).

A doença cardíaca coronariana é a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo ocidental. Existe grande evidência de que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) estão envolvidas na iniciação e promoção da aterosclerose. Quando as partículas de LDL ficam aderidas na artéria, elas podem sofrer oxidação progressiva e ser captadas pelos macrófagos. Isto leva à formação de peróxidos de lipídeos e facilita o acúmulo de ésteres de colesterol, resultando na formação de células espumosas (células que englobam grandes quantidades de lipídeos). A presença de um grande número de células espumosas pode produzir uma concentração elevada de citocinas e fatores de crescimento, com distúrbio da matriz extracelular, proliferação de células musculares lisas e por fim, através da ruptura de placa decorrente da produção de substâncias que degradam o colágeno, a agregação plaquetária na região da estenose (SALONEN et al., 1992; KRINSKY, JOHNSON, 2005; FASSET, COMBES, 2012). Assim, a proteção contra a oxidação da LDL por antioxidantes pode contribuir para proteção contra a doença cardíaca coronária. De fato, a LDL é o maior transportador de licopeno e β -caroteno na circulação e esses carotenoides possuem a capacidade de sequestrar radicais livres e oxigênio singlete. Neste sentido,

diversos estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação inversa entre o consumo de carotenoides e o risco de desenvolvimento da aterosclerose e de doenças do coração (OLSON, 1994; MORRIS et al., 1994; STREET et al., 1994; IRIBARREN et al., 1997; KRITCHEVSKY et al., 1998; RAO, AGARWAL, 1998; KLIPSTEIN-GROBUSCH, 1999; HIRVONEN et al., 2000; ODEBERG et al., 2003, HAK et al., 2004; SESSO et al., 2004).

A suplementação dietética de carotenoides também tem demonstrado desempenhar um papel fundamental na prevenção de diversas doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (DA) (HAEGELE et al., 2000; MECOCCHI et al., 2002). Evidências demonstram que os alimentos ricos em antioxidantes reduzem o risco de doença de Alzheimer, ao inibir o estresse oxidativo. Igualmente, os efeitos protetores dos carotenoides contra danos oxidativos têm sido levado em consideração no tratamento, na prevenção ou no retardo da progressão da DA (POLIDORI, 2003; RISO et al., 2003).

Nos cérebros de pacientes com DA, sinais de degeneração neuronal podem ser monitorados por meio de marcadores de ativação da microglia e inflamação, bem como pelo dano oxidativo. Pangestuti e colaboradores (2013) evidenciaram efeitos supressores da fucoxantina na

fosforilação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). Além disso, a fucoxantina foi capaz de inibir a oxidação do DNA induzida por radicais livres em linhagem de células microgliais murinas imortalizadas BV2. Os resultados deste estudo sugerem que a fucoxantina pode servir como um regulador de *feedback* negativo da inflamação e estresse oxidativo em células BV2 e, assim, proteger as células neuronais de mediadores neurotóxicos liberados pela microglia (PANGESTUTI et al., 2013).

Estudos epidemiológicos também têm mostrado existir uma relação inversa entre o risco de vários tipos de câncer e a ingestão alimentar ou a concentração sanguínea de carotenoides. Além de seu possível papel na prevenção do câncer, evidências indicam que os carotenoides são promissores para o tratamento dessa doença. O efeito antiproliferativo destes compostos foi observado em estudos em cultura de células neoplásicas, em modelos animais de carcinogênese induzida, e em estudos clínicos. Por exemplo, o betacaroteno, o licopeno e a luteína mostram-se eficazes na fase de iniciação e/ou nas fases de promoção e/ou progressão do câncer, em carcinomas de pele, de fígado, de próstata, e da cavidade oral, em animais. Tais efeitos têm sido associados à elevada atividade antioxidante destes compostos (MAIO et al., 2010). Entretanto, outro mecanismo que tem sido usado para

explicar os efeitos protetores dos carotenoides frente ao desenvolvimento do câncer refere-se a sua capacidade de exercer efeito indutor sobre as junções comunicantes ou junções *gap*. As junções *gap* são canais entre as células que permitem o fluxo intercelular de compostos de baixa massa molecular, como nutrientes e moléculas de sinalização. Estudos mostraram que, entre os carotenoides, o β -caroteno e a astaxantina são os indutores mais potentes da comunicação intercelular (STAHL et al., 1997). Em cultura de células, os carotenoides mostraram ser capazes de inibir reversivelmente a progressão de fibroblastos no estado inicial da carcinogênese em fibroblastos no estado transformado. Este efeito inibitório foi relacionado ao aumento das comunicações intercelulares, induzidas por estes compostos, cuja função está implicada na regulação do crescimento celular, diferenciação e apoptose (TROSKO, CHANG, 2000; STHAL, SIES, 2005). Estudos igualmente mostraram que os carotenoides são capazes de induzir a produção de enzimas da fase I e II, que desempenham um importante papel na eliminação de carcinogênicos e toxinas do organismo. Estas modificações nos níveis de proteínas regulatórias parecem estar relacionadas com a capacidade dos carotenoides em modular vários fatores de transcrição que são atores chave no processo de síntese de novas proteínas celulares (SHARONI, DANILENKO, LEVY, STAHL, 2004).

A homeostase óssea é mantida através de um equilíbrio entre a formação óssea osteoblástica e reabsorção óssea osteoclástica. O envelhecimento induz perda óssea devido à diminuição da formação óssea osteoblástica e aumento da reabsorção óssea osteoclástica. A osteoporose é acompanhada de decréscimo da massa óssea, sendo amplamente reconhecida com um grande problema de saúde pública. Fatores nutricionais podem desempenhar um papel importante na prevenção da perda de massa óssea com a idade. Sabe-se que o estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese do sistema esquelético, incluindo osteoporose, a doença óssea metabólica mais comum. O estresse oxidativo controla as funções dos osteoclastos e osteoblastos. Antioxidantes endógenos e sintéticos neutralizam os efeitos do estresse oxidativo nestas células. A descoberta de que o licopeno tem um efeito estimulador na proliferação de células e da fosfatase alcalina, um marcador de diferenciação de osteoblastos, bem como os seus efeitos inibitórios sobre a formação e reabsorção de osteoclastos são evidências do envolvimento dos carotenoides na saúde óssea (KIM, RAO, RAO, 2003). Vários outros carotenoides como a β -criptoxantina, luteína, β -caroteno, astaxantina além do flavonoide rutina tem demonstrado exercer um efeito estimulador sobre a calcificação óssea *in vitro* (PROMISLOW et al., 2002; RAO et al., 2003; YAMAGUCHI,

UCHIYAMA, 2003; YAMAGUCHI, UCHIYAMA, 2004; MAGGIO et al., 2006; RAO et al, 2007; MACKINNON, RAO, RAO, 2011).

Existem evidências *in vitro* e *in vivo* que β -caroteno evita danos foto-oxidativos e protege contra as queimaduras solares. Stahl e colaboradores (2000) investigaram os efeitos protetores da suplementação oral com carotenoides e de uma combinação de carotenoides e vitamina E contra o desenvolvimento de eritema induzido pela luz ultravioleta em humanos. Neste estudo, os autores mostraram que o eritema na pele dorsal (costas) diminuiu significativamente ($P < 0,01$) após oito semanas, e a supressão do eritema foi maior com a combinação de vitamina E e carotenoides, do que com os carotenoides isoladamente.

Urikura e colaboradores (2011) avaliaram o efeito protetor da fucoxantina contra o fotoenvelhecimento induzido por radiação UVB em camundongos sem pelos. As peles dorsais foram tratadas topicamente com uma solução de fucoxantina 0,001% a cada 2 horas, antes da irradiação UVB, 5 vezes por semana, durante 10 semanas. A formação de rugas na pele irradiada por UVB dos animais tratados com veículo aumentaram significativamente, em comparação com o controle não irradiado. O tratamento tópico com a fucoxantina diminuiu significativamente a hipertrofia epidérmica induzida

por UVB, a expressão da VEGF e MMP-13 na epiderme, e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) na pele. Estes resultados indicam que o tratamento tópico com a fucoxantina reduz o fotoenvelhecimento da pele em animais irradiados com radiação UVB, possivelmente através de efeitos antioxidantes e anti-angiogênicos.

Shimoda e colaboradores (2012) avaliaram o efeito da β -criptoxantina na pigmentação induzida por UVB e na expressão de RNAm relacionada à melanogênese, em pele de ratos. Além disso, as alterações nas moléculas melanogênicas foram avaliadas em cultura de melanócitos estimulados com prostaglandina (PGE_2), hormônio estimulante de melanócito (MSH) e a endotelina-1. Os autores demonstraram que a administração oral de β -criptoxantina suprime a melanogênese induzida por UVB, bem como inibe as enzimas melanogênicas e os receptores de estimuladores da melanogênese.

3.4. ASTAXANTINA

3.4.1 Características estruturais

A astaxantina (3,3'-dihidroxi- β,β' -caroteno-4,4'-diona) (Figura 4) é um carotenoide que contém 40 átomos de carbono, pertencente a subclasse das xantofilas, a qual é caracterizada pela presença de oxigênio em sua estrutura molecular. É estruturalmente similar ao β -caroteno e a outras xantofilas, como a luteína, cataxantina e zeaxantina, que têm em comum uma longa cadeia hidrocarbonada, com ligações duplas conjugadas (cadeia poliênica), contendo um anel de carbono em cada uma das extremidades. Difere dos outros carotenoides pela presença de grupamentos hidroxila (-OH) e cetona (C=O) nos anéis terminais, os quais conferem à molécula uma maior polaridade e maior atividade antioxidante, quando comparado aos demais. Na forma livre, a astaxantina é particularmente instável e suscetível à oxidação. Portanto, é encontrada na natureza na forma conjugada com proteínas (ex.; músculo do salmão ou exoesqueleto da lagosta) ou esterificada com uma ou duas cadeias de ácidos graxos. Na *H. pluvialis*, a forma esterificada predomina na forma de um monoéster. Ainda, vários isômeros de astaxantina têm sido caracterizados com base na configuração dos dois grupamentos hidroxilas da molécula. O estereoisômero 3*S*,3'*S* é a principal forma encontrada na *H. pluvialis*, enquanto a forma sintética contém principalmente o isômero 3*R*,3'*S* (HIGUIERA-CIAPARA et al., 2006; KIDD, 2011; HUSSEIN et al., 2006).

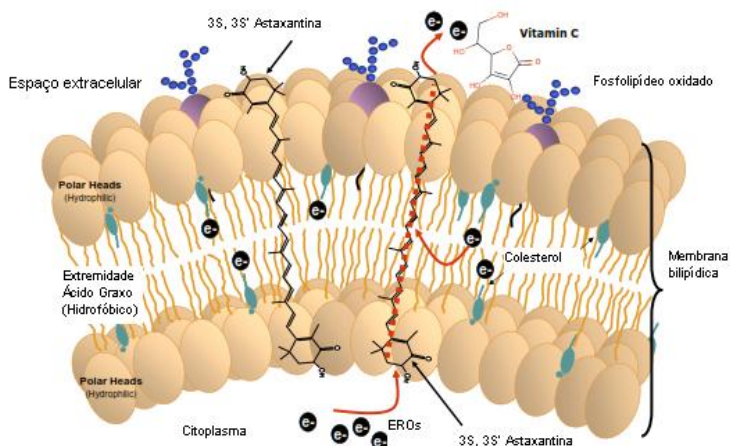


Figura 5. Alinhamento transmembranar da astaxantina 3S',3S, a principal forma molecular da *H. pluvialis*. Os grupos terminais polares se sobrepõem às zonas polares limítrofes da membrana, enquanto o meio apolar se encaixa no interior apolar da mesma. A linha vermelha pontilhada indica especulativamente a condução de elétrons como um “para-raios” ao longo da molécula de astaxantina, possivelmente para a vitamina C ou outros antioxidantes localizados fora da membrana (Adaptado de PASHKOW, WATUMULL, CAMPBELL, 2008).

3.4.2 Propriedades farmacocinéticas

Devido à baixa solubilidade aquosa, os carotenoides xantofílicos apresentam baixa biodisponibilidade, sendo menor que a de outros lipídeos, como os triglicerídeos. Entretanto, a presença de grupos polares terminais confere à astaxantina uma maior absorção, quando comparado com outros carotenoides, como o licopeno e betacaroteno.

A astaxantina é presente na natureza principalmente na forma de ésteres de ácidos graxos, que necessitam ser hidrolisados para que ocorra a absorção. A colesterol esterase é a principal enzima envolvida na sua hidrólise, e a forma livre é então incorporada a micelas no intestino delgado. A entrada da astaxantina nos enterócitos ocorre principalmente por difusão passiva, entretanto, o mecanismo de difusão facilitada também pode estar envolvido na sua absorção. A forma livre (não esterificada) passa então a ser detectada em todas as frações de lipoproteínas, incluindo quilomícrons, lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteínas de alta densidade (HDL) (YANG, KIM, LEE, 2013).

Estudos mostraram que, após a administração de uma dose de 100 mg de astaxantina livre pela via oral, os níveis plasmáticos máximos foram de $1,3 \text{ mg} \pm 0,1 \text{ mg/L}$, com tempo de meia-vida de $21 \pm 11 \text{ h}$ em seres humanos. A administração de diésteres de astaxantina resultou em níveis plasmáticos mais

baixos, ou seja, $0,28 \pm 0,12$ mg/L, com tempos de meia-vida mais estendidos de 52 ± 40 h, indicando, assim, que a etapa de hidrólise adicional reduz a velocidade de absorção da astaxantina (YANG, KIM, LEE, 2013).

Há poucas informações sobre o metabolismo da astaxantina. Estudos mostraram que, em hepatócitos de rato, a astaxantina é convertida nos metabólitos 3-hidroxi-4-oxo- β -ionona e na sua forma reduzida 3-hidroxi-4-oxo-7,8-diidro- β -ionona. Entretanto, o mecanismo exato pelo qual a astaxantina é metabolizada no fígado ainda não foi completamente elucidado (HUSSEIN et al., 2006; YANG, KIM, LEE, 2013).

3.4.3 Toxicidade

Diversos estudos em animais e em humanos têm demonstrado a segurança da astaxantina. Em um estudo randomizado, duplo-cego e placebo controlado, foi avaliado o efeito da suplementação diária de extrato de *H. pluvialis*, correspondendo a dose de 6 mg/kg/dia de astaxantina, em adultos saudáveis, durante oito semanas. Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas na pressão sanguínea e nos parâmetros séricos dos indivíduos que receberam o extrato, quando comparado com o grupo controle,

exceto para os níveis séricos de cálcio, proteínas totais e eosinófilos, mas estes não foram considerados clinicamente significantes (SPILLER, DEWELL, 2003).

Além disso, a administração de uma dose única de 100 mg de astaxantina em homens de meia idade (ØSTERLIE, BJERKENG, LIAAEN-JENSEN, 2000), de uma dose diária de 40 mg durante quatro semanas em pacientes com dispepsia funcional (KUPCINSKAS et al., 2008), e de uma dose diária de 4 mg por doze meses em pacientes com degeneração macular (PARISI et al., 2008), não induziu ao aparecimento de quaisquer efeitos colaterais adversos.

Assim, até o momento não foram relatados efeitos adversos secundários com a suplementação de astaxantina em humanos. Em 2010, a *Food and Drug Administration* classificou o status da astaxantina extraída da *H. pluvialis* como "geralmente reconhecido como seguro" (do inglês, *generally recognized as safe* - GRAS) (YANG, KIM, LEE, 2013).

3.4.4 Propriedades biológicas

3.4.4.1 Câncer

A astaxantina tem demonstrado potentes propriedades quimiopreventivas. Os mecanismos de atividade antitumoral propostos para a astaxantina são sumarizados na Figura 6. Diversos grupos de pesquisa têm estudado o efeito da suplementação oral de astaxantina em vários tipos câncer, e os resultados mostraram que a astaxantina inibe significativamente a proliferação celular em câncer de bexiga urinária, próstata, mama, cólon e da cavidade oral (ZHANG et al., 2014).

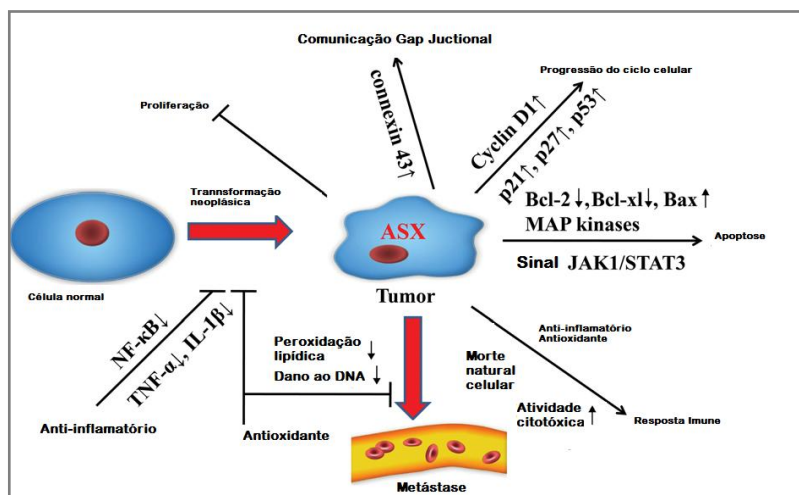


Figura 6. Mecanismos de atividade antitumoral da astaxantina.

Uma característica da carcinogênese é a perda da comunicação juncional mediada por junções GAP (GJCs, do inglês *gap junction communication*), as quais são importantes para a homeostase, controle do crescimento e desenvolvimento das células. As proteínas conexinas (Cxs) são os principais componentes responsáveis pela comunicação intercelular nas junções GAP e a Cx43 é a conexina mais amplamente expressa. Os carotenoides podem induzir a comunicação intercelular através da ativação das junções *gap*, que está correlacionada com a inibição do crescimento de células quimicamente transformadas. O derivado succinato sódico da astaxantina, solúvel em água, funcionalmente aumentou a comunicação juncional por meio da supregulação (*upregulation*) da expressão da Cx43, bem como pelo aumento do tamanho e do número de placas juncionais gap imunorreativas Cx43 (ZHANG et al., 2014).

Estudos têm relatado que astaxantina melhora a resposta imune aos tumores, atenuando acentuadamente a formação de metástases. Tais efeitos têm sido associados com a inibição da peroxidação lipídica induzida pelo estresse. A astaxantina também mostrou ser capaz de proteger contra a progressão pré-neoplásica colônica quimicamente induzida em ratos, por meio do aumento dos níveis de antioxidantes enzimáticos e não

enzimáticos, bem como pela inibição da peroxidação lipídica. Finalmente, a astaxantina mostrou ser capaz de induzir a apoptose em várias linhagens de células de câncer de cólon. Os efeitos do extrato de *H. pluvialis* sobre o crescimento celular e sobre a apoptose mostraram ser mais significantes que aquele produzido pela astaxantina pura, suportando os potenciais benefícios do extrato desta alga na quimioprevenção (ZHANG et al., 2014).

3.4.4.2 Doenças inflamatórias

Estudos têm mostrado que a astaxantina exerce propriedades anti-inflamatórias, pelo menos em parte, pela inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B). O NF- κ B é um fator de transcrição envolvido no controle da expressão de diversos genes ligados à resposta inflamatória (YANG, KIM LEE, 2013). A astaxantina também diminuiu a produção de óxido nítrico (NO), prostaglandina E₂ (PGE₂) e TNF α , bem como a atividade da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), em macrófagos estimulados por LPS. Estudos sugerem que a propriedade antioxidante da astaxantina está ligada à sua função anti-inflamatória bem como ao efeito inibidor sobre a

via do NF- κ B, em vários modelos celulares (OHGAMI et al., 2003; LEE et al., 2003).

Yasui e colaboradores (2011) avaliaram o efeito da astaxantina sobre a colite e da colite associada à carcinogênese do cólon em ratos, via modulação de citocinas inflamatórias. Os resultados encontrados demonstraram que a astaxantina inibe significativamente a ocorrência de úlceras de cólon, criptas displásicas e adenocarcinoma do cólon, após vinte semanas de tratamento. A alimentação com astaxantina suprimiu a expressão de citocinas inflamatórias, incluindo (NF)- κ B, fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 β , com inibição da proliferação celular e indução da apoptose em adenocarcinomas do cólon. Os resultados sugerem que a astaxantina é uma das candidatas para a prevenção de colite associada à inflamação e carcinogênese em cólon.

Terazawa e colaboradores (2012) avaliaram o efeito da astaxantina sobre a secreção de PGE₂ e IL-8 induzida por UVB em cultura de queratinócitos humanos e analisaram o seu mecanismo de ação biológico (Figura 7). A adição de astaxantina aos queratinócitos humanos, mesmo após irradiação com UVB, infraregulou (*downregulated*) a secreção aumentada de PGE₂ ou IL-8. Esses efeitos supressores foram acompanhados por uma diminuição significativa da expressão de genes que codificam para a COX-2 ou IL-8, bem como da

proteína COX-2. A astaxantina inibiu o aumento da fosforilação induzida pela radiação UVB da proteína quinase ativada por mitógeno ou por estresse (MAP), NF- κ B p65, ou do CREB, mesmo após a irradiação. Estes resultados sugerem que a astaxantina atenua a auto-fosforilação de MSK1 necessária para a sua ativação, o que resulta na diminuição da fosforilação de NF- κ B p65, ou o qual, por sua vez, provavelmente conduz a uma deficiência da ligação do NF- κ B ao DNA.

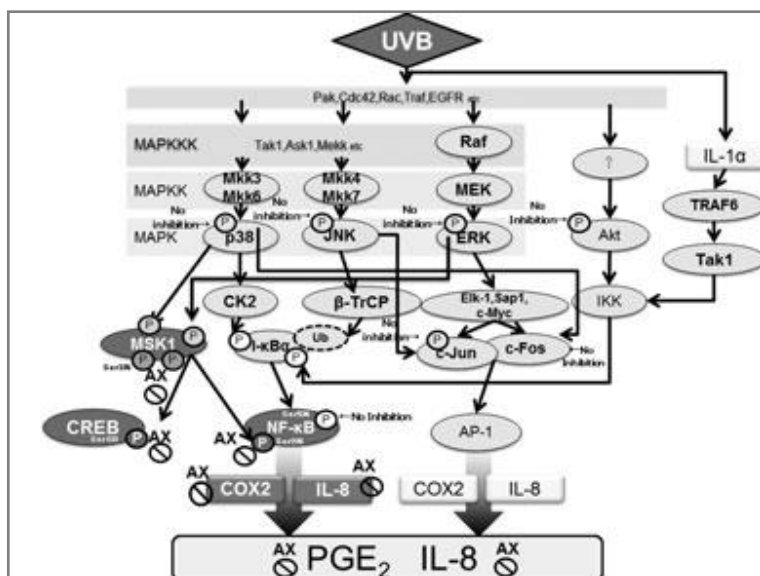


Figura 7. Vias de sinalização intracelular que leva a aumento induzido por UVB de PGE₂/IL-8 e inibição da secreção local

pela astaxantina no tratamento pós-irradiação (TERAWAZA et al, 2012).

3.4.4.3 Doenças cardiovasculares

Como mencionado anteriormente, a astaxantina apresenta propriedades anti-inflamatórias, atuando por meio da inibição da ativação do NF- κ B. A astaxantina também tem mostrado ser eficaz na redução dos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O aumento da LDL oxidada pode induzir macrófagos a se tornarem células espumosas, que subsequentemente formarão as camadas de gordura, sendo isto uma característica da aterogênese precoce. Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que a astaxantina suprimiu a oxidação de LDL de modo dose dependente (IWAMOTO et al., 2000; JACOBSSON et al., 2004). Augusti e colaboradores (2001) demonstraram que a ingestão diária de astaxantina previne a hipercolesterolemia induzida pela oxidação de proteínas. Além disso, a atividade da superóxido redutase e tioredoxina redutase melhorou consideravelmente após a suplementação de astaxantina, em coelhos.

O efeito anti-hipertensivo da astaxatina em ratos hipertensos foi avaliado por Hussein et al. (2005). Neste

estudo, os autores mostraram que a astaxantina administrada por via oral durante 14 dias reduz a pressão arterial e que a administração a longo prazo por 5 semanas, na dose de 50 mg/kg, reduz a incidência de AVC nos animais. Os autores mostraram também que a astaxantina induz a vasorelaxação mediada pelo NO, o qual pareceu estar envolvido na atividade anti-hipertensiva observada. A astaxantina também mostrou efeitos neuroprotetores significativos em camundongos isquêmicos, provavelmente devido a sua atividade antioxidante.

Nakao e colaboradores (2010) avaliaram o efeito da suplementação diária de astaxantina na redução do estresse oxidativo e melhora da função cardíaca em camundongos BALB/c, sugerindo o possível uso da astaxantina na dieta para a proteção cardíaca. Monroy-Ruiz et al. (2011) também mostraram que a astaxantina exerce efeitos de redução da hipertensão arterial, associando estes efeitos à melhora da vasodilatação dependente do endotélio, melhora da remodelagem cardiovascular, e à redução da produção de $\bullet\text{O}_2^-$ estimulado por NADPH-oxidase. Efeitos antitrombóticos e anti-hipertensivos também foram observados em ratos tratados com astaxantina, os quais foram relacionados a um aumento da biodisponibilidade do NO, provavelmente mediada pela

redução da inativação da NO por espécies reativas de oxigênio (SASAKI et al., 2011).

3.4.4.4 Efeito antidiabético

A diabetes Tipo 2 é uma doença metabólica crônica que é caracterizada por secreção insuficiente ou ação de insulina endógena e hiperglicemia. Vários estudos têm demonstrado que o stress oxidativo induzido por hiperglicemia promove a resistência à insulina e contribui para a patogênese da diabetes. O consumo de antioxidantes que melhoram o estresse oxidativo pode ser considerada como uma estratégia eficaz para prevenir a diabetes e as suas complicações associadas (JOHANSEN, HARRIS, RYCHLY, ERGUL, 2005).

Efeitos antidiabéticos da astaxantina foram relatados em modelos animais com diabetes. Quando ratos db/dB foram alimentados com uma suplementação de astaxantina, numa dose diária de 1 mg, durante doze semanas, os níveis de glicose sanguínea pós-prandial reduziram e a tolerância à glicose foi melhorada (UCHIYAMA et al., 2002). A administração oral de astaxantina na dose de 5 e 10 mg/kg também produziu uma queda significativa nos níveis plasmáticos de glicose, em ratos

com diabetes induzida pela administração endovenosa de aloxana (WANG et al., 2012)

3.4.4.5 Efeitos fotoprotetores e dermocosméticos

Camera e colaboradores (2008) avaliaram o efeito dos carotenoides astaxantina, cantaxantina e β -caroteno sobre o dano causado pela radiação UVA, em cultura de fibroblastos dérmicos humanos (HDF). As células tratadas 24 horas antes com os carotenoides foram expostas a doses moderadas de UVA, que induziram à apoptose, a níveis elevados de espécies reativas ao oxigênio e de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, à redução da atividade das enzimas antioxidantes, à promoção da perturbação da membrana e à indução da expressão da enzima heme oxigenase-1 (HO-1). Dentre os carotenoides estudados, a astaxantina exibiu um efeito fotoprotetor pronunciado e combateu todas alterações induzidas pela radiação UVA de modo significativo. A captação da astaxantina pelos fibroblastos foi maior do que a dos outros dois carotenoides. Os resultados indicaram que a astaxantina possui um efeito preventivo excelente frente às mudanças foto-oxidativas, em cultura de células.

Tominaga e colaboradores (2012) avaliaram o benefício cosmético da astaxantina derivada da microalga *Haematococcus pluvialis* em humanos. O efeito da combinação de suplementação oral e aplicação tópica de astaxantina foi analisada em trinta mulheres durante oito semanas. A astaxantina produziu melhorias nas rugas, na elasticidade e na textura da pele, no teor de umidade e nas condições da camada de corneócitos. Esses resultados sugerem que a astaxantina melhora as condições da pele, em todas as camadas (corneócitos, epiderme, derme e camada basal), quando a suplementação oral e o tratamento tópico são combinados (TOMINAGA et al., 2012).

Yoshihisa e colaboradores (2014) avaliaram os efeitos protetores da astaxantina contra apoptose induzida por radiação ultravioleta. Os autores verificaram que o tratamento com astaxantina causou uma redução na expressão do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF), IL-1 β e TNF- α em queratinócitos HaCaT. Estes resultados sugerem que a astaxantina protege eficazmente contra a inflamação induzida por UV, através da diminuição de iNOS e COX-2, inibindo a apoptose nos queratinócitos.

3.5 SECAGEM POR ASPERSÃO (*SPRAY-DRYING*)

A secagem por aspersão (*spray-drying*) consiste na transformação de um produto no estado fluído para o estado sólido, na forma de pó, por meio da dispersão de gotículas do material dentro de uma câmara apresentando uma corrente de ar aquecido. Neste momento, ocorre a transferência de calor do ar aquecido às gotículas, levando à evaporação rápida do líquido da superfície da gota. O produto de secagem é então transportado por uma corrente de ar, sendo posteriormente coletado (MASTERS, 1985; OLIVEIRA, PETROVICK, 2009). O termo aspersão refere-se à divisão do líquido em milhões de partículas individuais formando uma nuvem ou *spray* (MASTERS, 1985). O principal objetivo da secagem é a retirada de água, na qual é responsável por propiciar um meio para a ocorrência de reações químicas, fenômenos físicos e crescimento microbiano (OLIVEIRA, PETROVICK, 2009). O controle da umidade ocorre por meio da otimização dos parâmetros de processo, como o fluxo e a temperatura (CAL, SOLLOHUB, 2010).

A secagem por aspersão (*spray drying*) tem sido amplamente empregada na indústria farmacêutica, primeiramente, com o objetivo de obter produtos secos para a sua utilização em ciclos de produção de formas farmacêuticas

sólidas (OLIVEIRA, PETROVICK, 2009). A secagem por aspersão também tem sido utilizada como estratégia para aumentar a solubilidade aquosa de fármacos ou, ainda, para melhorar as características de fluxo dos pós (BROADHEAD et al, 1992). A grande utilização da secagem por *spray drying* deve-se à vantagem relacionada ao baixo risco de degradação química durante a operação, em decorrência do curto tempo de contato do líquido disperso com a fonte de calor, o que permite a obtenção de pós a partir de materiais termossensíveis. Aliado a isso, a versatilidade na obtenção de pós, grânulos e aglomerados, o elevado rendimento por tempo de produção, e a realização de um processo em uma única etapa com custos mais baixos, quando comparado a outras técnicas de secagem, tornam esta técnica amplamente aplicável na produção de medicamentos, em especial de produtos fitoterápicos e nutracêuticos, com elevado teor de substâncias terapeuticamente ativas, tais como compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides, entre outros (MASTERS, 1985; OLIVEIRA et al., 2009).

Um esquema representativo de um equipamento de secagem por aspersão é mostrado na Figura 8. Os componentes que estão presentes em todos equipamentos de secagem por aspersão incluem o sistema de alimentação, atomizador, sistema de aquecimento, câmara de secagem, ciclone acoplado

ao recipiente de coleta e exaustor ou aspirador (MASTERS, 1985). Existem diferentes configurações de equipamentos, os quais variam em tamanho e forma da câmara de secagem, tipo de atomizador (atomizadores rotatórios, de pressão, pneumáticos e ultrassônicos), sistema de contato do ar aquecido com o produto aspergido (cocorrente ou contracorrente), e sistemas de coleta do produto (OLIVEIRA et al., 2009).

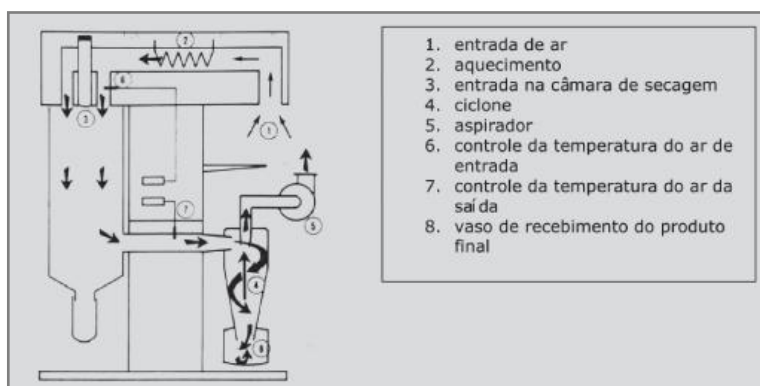


Figura 8. Esquema de um spray dryer e do fluxo de secagem (Fonte: LANNES, MEDEIROS, 2003).

As variáveis geralmente monitoradas incluem a temperatura do ar de secagem na entrada e saída da câmara de secagem, e a umidade e fluxo do ar aquecido e do fluido a ser seco. Em geral, o teor de umidade do produto seco está

diretamente ligado à temperatura do ar que deixa a câmara de secagem. Teores de umidade mais baixos podem ser obtidos pelo aumento da temperatura do ar de saída ou pelo aumento do tempo de residência do material a ser seco no interior da câmara de secagem. O teor de umidade afeta, por sua vez, as características finais do produto seco, como solubilidade, densidade e fluxo. Entretanto, a exposição de substâncias termossensíveis a altas temperaturas por longos períodos pode levar a degradação das mesmas. Assim, o controle das condições de processo é fundamental para obtenção de produtos com propriedades físicas e químicas desejáveis (VASCONCELOS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2009).

A necessidade de utilizar adjuvantes de secagem tem sido evidenciada por diversos autores, tanto como fator crítico no rendimento do processo, como na padronização da qualidade e manutenção da estabilidade de produtos secos obtidos por *spray drying*. Carboidratos de elevada massa molar como o amido e amidos modificados, maltodextrinas, xaropes de milho, goma arábica, dióxido de silício coloidal e ciclodextrinas têm sido amplamente empregados. Uma das funções dos adjuvantes de secagem consiste em aumentar a temperatura de transição vítrea do produto, reduzindo a aderência e a deposição dos pós na parede da câmara de secagem, assim como reduzir a tendência à aglomeração das

partículas durante a secagem e o armazenamento, gerando um produto mais estável. A ocorrência de fenômenos de aderência e coesão é comum durante a secagem de extratos vegetais e está relacionada à presença de elevadas quantidades de açúcares, carboidratos e ácidos orgânicos, o que torna obrigatória a adição de adjuvantes de secagem nesses produtos. Estes adjuvantes podem ser usados sozinhos ou em associação, de modo que as proporções ideais devem ser estabelecidas para cada caso (OLIVEIRA et al., 2009).

Em especial, o dióxido de silício coloidal tem sido amplamente utilizado por atender os requisitos necessários para a obtenção de um produto final com as características desejadas. Este adjuvante atua como adsorvente, além de apresentar elevada pureza, inércia química e inocuidade. Devido a sua alta superfície específica ($200 \text{ m}^2/\text{g}$), o dióxido de silício coloidal apresenta vantagens sobre os outros adjuvantes, pois, ao adsorver as partículas da solução extrativa, diminui a superfície exposta das mesmas, minimizando a aderência do produto na câmara de secagem durante a exposição das gotículas de calor, favorecendo, assim, a obtenção de um produto menos sensível à umidade e com melhores propriedades de fluxo. Estudos têm mostrado que o dióxido de silício conduz à obtenção de pós com elevado rendimento e boas características de fluxo, além de desempenhar um papel

significativo na melhoria da solubilidade (DA SILVA, COUTO, BRESOLIN, 2012).

Alguns trabalhos descrevem o uso da secagem em torre de aspersão para obtenção de biomassa algal. Leach e colaboradores (1998) avaliaram o efeito das condições de secagem, como temperatura de entrada e de saída e uso de adjuvantes, sobre o teor de carotenoides da biomassa de *Dunalliella salina*, empregando um desenho experimental do tipo 2³. Os estudos mostraram que a recuperação dos carotenoides aumentou com a redução da temperatura de secagem, e que o uso de adjuvantes provocou um aumento na estabilidade dos mesmos durante o armazenamento. Ryckebosch e colaboradores (2011) avaliaram a influência do processo de secagem na estabilidade de lipídeos e carotenoides da microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Os autores mostraram a maior suscetibilidade dos carotenoides frente à oxidação quando a técnica de *spray-drying* foi utilizada. Um decréscimo de cerca de 25% no conteúdo de carotenoides totais foi observado, tendo sido a decomposição térmica e complexação os prováveis responsáveis por esta diminuição. Mais recentemente, o efeito da secagem por *spray-drying* e armazenamento sobre o teor de astaxantina na biomassa de *H. pluvialis* foi avaliado por Raposo e colaboradores (2012). Os autores mostraram que a biomassa seca em temperaturas de

entrada e saída de 180 °C e 110 °C, respectivamente, e armazenada a -21 °C em atmosfera de nitrogênio foram as melhores condições para a manutenção da astaxantina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matérias-primas e reagentes

2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich, EUA);

Astaxantina (Sigma-Aldrich, EUA);

Biomassa de *Haematococcus pluvialis* (Algamac AST;

Aquafauna Bio-Marine, Hawthorne, EUA).;

Dioxido de silício coloidal (Aerosil[®], Pharmanostra, Brasil);

Lauril sulfato de sódio (Vetec, Diprolab, Brasil);

4.1.2 Solventes

Acetona P.A. (Vetec, Brasil);

Acetonitrila grau HPLC (Tedia Brasil, Brasil);

Ácido clorídrico P.A. (Vetec, Brasil);

Éter de petróleo PA (Vetec, Brasil);

Metanol grau HPLC (Tedia Brasil, Brasil).

4.1.3 Equipamentos

Aparelho para determinação da densidade compactada (Copley®, Inglaterra);

Balança analítica AS2000 (Ohaus Corporation, EUA);

Calorímetro exploratório diferencial DSC-50 (Shimadzu, Japão);

Centrífuga de bancada 4K15 Sigma (Sigma, EUA);

Centrífuga de bancada NT 810 (Novatécnica®, Brasil);

Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu, Japão);

Difratômetro a laser Mastersizer 2000 (Malvern, Inglaterra);

Dissolutor 299 (Nova Ética, Brasil);

Espectrofotômetro IR Prestige 21 (Shimadzu, Japão);

Espectrofotômetro UV/Visível UV-1800 (Shimadzu, Japão);

Evaporador rotatório (Quimis, Brasil);

Leitora de Microplaca (Elisa) Automática (TermoPlate®);

Microscópio JEOL JSM -6390LV (JeolLtda, EUA);

Mini-spray dryer B-191 (Büchi, Labortechnik AG, Suíça);

pHmetro Oakton WD-35613-00 (Oakton, EUA);

Recobridora à vácuo Bal-tec SCD005 (BAL-TEC AG, Liechtenstein);

Titulador Karl Fischer modelo DL31 (Mettler Toledo, EUA).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Caracterização da Biomassa de *H. pluvialis*

Haematococcus pluvialis é uma microalga verde, móvel, unicelular com diâmetro de 15 a 20 µm, fotossintética e capaz de sintetizar e acumular o pigmento astaxantina em resposta às condições ambientais (DONG; ZHAO, 2004). A biomassa empregada para realização deste trabalho é um produto comercial de *Haematococcus pluvialis* na forma de um pó de coloração vermelha escura, obtido pela técnica de secagem em torre de aspersão (*spray-drying*), denominado Algamac AST (Aquafauna Bio-marine, EUA). A biomassa de *H. pluvialis* foi cedida pelo professor Dr. Roberto Bianchini Derner do Departamento de Aquicultura da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

4.2.1.1 Determinação da perda por dessecação

A perda por dessecação da biomassa de *H. pluvialis* foi determinada pelo método gravimétrico (THE UNITED, 2007). Cerca de 1 g da biomassa foram pesados em pesa-filtros

previamente tarados e colocados em estufa a 105° C, durante 2 h. Após, os pesa-filtros foram resfriados em dessecador e pesados. As amostras foram submetidas à dessecação em estufa por mais 1 h, após novamente resfriada e pesada. Este procedimento foi repetido até obtenção de massa constante. Os resultados foram expressos como perda de massa percentual, pela média de três determinações.

4.2.1.2 Determinação do tamanho e distribuição granulométrica

O tamanho e distribuição granulométrica da biomassa de *H. pluvialis* foi determinada por difratometria a laser utilizando um analisador de partículas *Mastersizer 2000* (Malvern Instruments, Reino Unido), com luz monocromática vermelha (632,8 nm) de um laser de He Ne, com obscurecimento entre 10 e 13%. Para as análises, cerca de 30 mg da biomassa foi previamente dispersa em água. As análises foram realizadas em triplicata. A distribuição do tamanho foi determinada com base na teoria de difração de *Franhöffer* e expressa em diâmetro por volume equivalente a 10 ($d_{10\%}$), 50 ($d_{50\%}$) e 90 ($d_{90\%}$) do volume acumulado e diâmetro médio ($d_{4,3}$). Os valores de

Span, que correspondem ao grau de polidispersão da amostra, foram calculados segundo a equação 1 abaixo.

$$Span = \frac{d_{90\%} - d_{10\%}}{d_{50\%}} \quad \text{Equação 1}$$

4.2.1.3 Avaliação da morfologia

A morfologia das partículas da biomassa de *H. pluvialis* foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em Microscópio Jeol JSM-6390LV (LCME/UFSC), com voltagem de 10 kV. A amostra foi fixada em porta-amostra (*stubs*) e recoberta com uma fina camada de ouro/paládio, utilizando-se recobridora à vácuo Bal-tec SCD005 (BAL-TEC AG, Liechtenstein). Micrografias das amostras foram obtidas em diversos aumentos.

4.2.2 Preparação e Caracterização da Solução Extrativa de *Haematococcus pluvialis*

4.2.2.1 Preparação da solução extrativa

A preparação da solução extrativa *Haematococcus pluvialis* (SEHP) foi realizada empregando o método clássico de extração de carotenoides, conforme descrito por Mezzomo e colaboradores (2011). Brevemente, foram pesados 5 g da biomassa de *Haematococcus pluvialis* e adicionados 200 mL de uma mistura de éter de petróleo:acetona:água (15:75:10, v/v/v). A mistura foi mantida sob agitação magnética por 24 horas a 5 °C e protegida da luz. Após esse período, a mistura foi centrifugada a 2500 rpm durante 5 min. Em seguida, 200 mL do líquido extrator fresco foram adicionados ao sedimento. O sobrenadante foi recolhido e denominado de solução extrativa de *H. pluvialis* (SEHP). Esta operação foi realizada 4x, com o objetivo de extrair a maior quantidade possível de carotenoides, resultando em volume final de 800 mL de SEHP. A SEHP foram preparadas em triplicata.

4.2.2.2. Caracterização da solução extrativa de *Haematococcus pluvialis*

4.2.2.2.1 Determinação do resíduo seco (FARMACOPEIA, 2010)

Cerca de 10 g da solução extrativa foram exatamente pesados em pesa-filtros previamente tarados e submetidos à evaporação até secura em banho-maria. Os pesa filtros foram colocados em estufa a temperatura de aproximadamente 105 °C durante 2 horas, resfriados em dessecador e pesados. Esta operação foi repetida até obtenção de peso constante. Os valores de resíduo seco (RS%, m/m) foram calculados conforme a equação 2 abaixo:

Equação 2

$$RS\% = \frac{m_2 - m_{PF}}{m_1 - m_{PF}} \times 100$$

em que m_1 é a massa em gramas do pesa filtro contendo a SEHP; m_2 é a massa em gramas do pesa filtro após dessecação, m_{PF} é a massa em gramas do pesa filtro vazio. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

4.2.2.2.2 Determinação do pH (FARMACOPEIA, 2010)

A determinação do pH da SEHP foi realizada em potenciômetro previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. Os resultados correspondem à média de três determinações.

4.2.2.2.3 Determinação da densidade relativa (FARMACOPEIA, 2010)

A medida da densidade relativa (d_{20}^{20}) da SEHP foi realizada com auxílio de um picnômetro de 25,0 mL, previamente calibrado por meio da pesagem do mesmo vazio e com água destilada. O picnômetro foi preenchido com a SEHP e, em seguida, pesado. A densidade relativa foi então calculada como sendo a razão entre a massa da amostra (SEHP) e a massa de água, medidas na mesma temperatura. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2.2.4 Determinação de carotenoides totais

A determinação dos carotenoides totais (CT, $\mu\text{g/mL}$) da SEHP foi realizada por método espectrofotométrico. Brevemente, uma alíquota de 1,0 mL da SEHP foi transferida para um balão e submetida à evaporação sob pressão reduzida em evaporador rotatório para eliminação do solvente. O resíduo foi então dissolvido em acetona, transferido para balão volumétrico de 25,0 mL e o volume final foi completado com o mesmo solvente. A solução resultante foi analisada no comprimento de onda de 320 a 700 nm em espectrofotômetro

UV/VIS 1800 (Shimadzu, Japão), usando acetona como branco. O da SEHP foi calculado conforme a equação 3:

Equação 3

$$CT = \frac{A \times 25}{\varepsilon \times 100}$$

Em que A é a absorbância da amostra, ε é o coeficiente de extinção específica da astaxantina em acetona ou 2198 (100 mL g⁻¹ cm⁻¹). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2.2.5 Determinação do teor de astaxantina na solução extrativa

A quantificação da astaxantina na SEHP foi realizada por metodologia analítica de cromatografia líquida de alta eficiência em modo de fase reversa, conforme metodologia desenvolvida pelo laboratório de morfogênese e bioquímica vegetal, no Centro de Ciências Agrárias da UFSC. As análises foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu SP 10A (Japão). As análises foram realizadas usando as seguintes condições cromatográficas: coluna C18 TP201 (Vydac, 250 mm x 4.6 mm d.i., 5 µm); fase móvel, metanol:acetonitrila (90:10, v/v);

fluxo de 1 mL/min, volume de injeção 10 µL e detecção a 477 nm.

O tempo de corrida foi de 13 min e a quantificação da astaxantina na amostra foi realizada com base na curva de calibração da astaxantina padrão ($y = 44231,56x$, $R^2 = 0,990$). Os resultados foram expressos em µg/mL pela média de três determinações.

4.2.3 Preparação e Caracterização dos Extratos Secos de *Haematococcus pluvialis* por Aspersão em Torre de Secagem (*Spray-Drying*).

4.2.3.1 Preparação dos Extratos Secos

Para obtenção dos extratos secos de *Haematococcus pluvialis* (ES), 400 mL da solução extrativa SEHP foram submetidos à evaporação sob pressão reduzida até completa remoção do solvente orgânico. O resíduo foi então ressuspenso em 400 mL de água destilada para obtenção de uma suspensão aquosa de *H. pluvialis*. A esta suspensão aquosa foi adicionada dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200), lentamente, sob agitação constante, durante 30 minutos. A dispersão foi seca em um mini *spray-dryer* Buchi B-191 (Suíça), disponibilizado

pelo Prof. Pedro Barreto do PPG em Ciências dos Alimentos. Os extratos secos foram coletados e pesados. Neste estudo, o efeito da temperatura de entrada (150 °C ou 175 °C) e da concentração de dióxido de silício coloidal (2%, 4% e 6%, m/V) sobre as características finais dos extratos secos foi avaliado, o que resultou na obtenção de 6 diferentes extratos secos. As condições de secagem empregadas estão mostradas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições de secagem utilizadas para obtenção dos extratos secos de *H. pluvialis*.

Parâmetros	ES1	ES2	ES3	ES4	ES5	ES6
Temperatura de entrada (°C)	150	150	150	175	175	175
Temperatura de saída (°C)	40	40	40	60	60	60
Fluxo da dispersão (mL/min)	4	4	4	4	4	4
Aspiração (%)	100	100	100	100	100	100
Concentração de Aerosil 200* (%)	2	4	6	2	4	4

* Em relação ao volume total da dispersão.

4.2.3.2 Caracterização do adjuvante dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200)

4.2.3.2.1 Determinação da perda por dessecação (THE UNITED, 2007)

A determinação da perda por dessecação do adjuvante de secagem dióxido de silício coloidal foi realizada gravimetricamente. Cerca de 1 g do adjuvante foram pesados e transferidos para pesa-filtros previamente tarados. As amostras foram colocadas em estufa de secagem a 105° C durante duas horas e, após, resfriadas e pesadas. As amostras foram submetidas à dessecação em estufa por mais 1 h, após novamente resfriada e pesadas. Este procedimento foi repetido até obtenção de massa constante. Os resultados foram expressos como perda de massa percentual, pela média de três determinações.

4.2.3.2.2 Determinação do pH (THE UNITED, 2007)

A determinação do pH da dispersão aquosa 4% (m/v) de dióxido de silício coloidal foi realizada em um potenciômetro calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0. O resultado expressa a média de três determinações.

4.2.3.2.3 Determinação do tamanho e distribuição granulométrica

A distribuição granulométrica do dióxido de silício coloidal foi avaliada por difratometria a laser utilizando um analisador de partículas Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Reino Unido), com luz monocromática vermelha (632 nm) de um laser de He Ne, com obscurecimento entre 10 e 13%. Para as análises, cerca de 30 mg de dióxido de silício coloidal foram dispersos em glicerol. As análises foram realizadas em triplicata. A distribuição do tamanho foi determinada com base na teoria de difração de *Franhöffer* e expressa em diâmetro por volume equivalente a 10 ($d_{10\%}$), 50 ($d_{50\%}$) e 90 ($d_{90\%}$) do volume acumulado e diâmetro médio ($d_{4,3}$), assim como pelo valor de *Span*.

4.2.3.2.4 Avaliação da morfologia

Micrografias do adjuvante dióxido de silício coloidal foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM-6390LV (LCME/UFSC) numa intensidade de 10 kV. A amostra foi fixada em *stubs* e recoberta com uma fina camada de ouro, usando recobridora à vácuo Bal-tec SCD005 (BAL-TEC AG, Liechtenntein).

4.2.3.3 Caracterização dos extratos secos

4.2.3.3.1 Rendimento

O rendimento bruto da operação de secagem foi estimado como sendo a diferença percentual entre a massa teórica de sólidos totais presente na suspensão de alimentação e a massa de extrado seco obtida. Os sólidos totais correspondem ao teor de resíduo seco da solução extrativa (SEHP), somada à massa de adjuvante adicionada, considerando o teor de umidade residual.

4.2.3.3.2 Teor de umidade residual (THE UNITED, 2007)

A umidade residual dos extratos secos de *H. pluvialis* foi determinada pela metodologia de Karl Fischer em um titulador Karl Fischer modelo DL31 (Mettler Toledo, EUA). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em percentagem de umidade residual (% , m/m).

4.2.3.3.3 Análise granulométrica

A distribuição granulométrica dos extratos secos de *H. pluvialis* foram determinadas por difratometria à laser utilizando um analisador de partículas Mastersizer 2000

(Malvern Instruments, Reino Unido), com luz monocromática vermelha (632nm) de um laser de He Ne, com obscurecimento entre 10 e 13%. Para as análises, cerca de 30 mg dos extratos secos foram previamente dispersos em glicerina. As análises foram realizadas em triplicata. A distribuição do tamanho foi determinada com base na teoria de difração de *Franhöffer* e expressa em diâmetro por volume equivalente a 10 ($d_{10\%}$), 50 ($d_{50\%}$) e 90 ($d_{90\%}$) do volume acumulado e diâmetro médio ($d_{4,3}$), assim como pelo valor de Span.

4.2.3.3.4 Avaliação da morfologia das partículas

A morfologia das partículas dos extratos secos foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em Microscópio Jeol JSM-6390LV (LCME/UFSC), com voltagem de 10 kV. A amostra foi fixada em porta-amostra (*stubs*) e recoberta com uma fina camada de ouro/paládio, utilizando-se uma recobridora à vácuo Bal-tec SCD005 (BAL-TEC AG, Liechtenstein). Micrografias das amostras foram obtidas em diversos aumentos.

4.2.3.3.5 Determinação da densidade aparente e de compactação

Para a determinação da densidade aparente, uma massa conhecida dos extratos secos foi colocada em uma proveta graduada e o volume inicial em repouso foi registrado. Os extratos secos foram então submetidos à compactação por meio de 1250 batidas em um aparelho para determinação da densidade compactada (Copley®, Inglaterra) e o volume dos pós foi novamente registrado. As densidades e de compactação (g/mL) foram então determinadas conforme equações 4 e 5 abaixo (GUO; BEDDOW; VETTER, 1985),

$$d_{aparente} = \frac{m}{V_1} \quad \text{Equação 4}$$

$$d_{compactada} = \frac{m}{V_2} \quad \text{Equação 5}$$

em que m é a massa da amostra em gramas, V_1 = volume inicial da amostra em mililitros (antes da compactação) e V_2 = volume da amostra após compactação em mililitros. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.3.3.6 Avaliação das propriedades de fluxo dos extratos secos

As propriedades de fluxo extratos secos de *H. pluvialis* foram avaliadas empregando o índice de compressibilidade ou índice de Carr e o fator de *Hausner*. O índice de Carr foi calculado conforme a equação 6:

Equação 6

$$\text{Índice de Carr} = \left(\frac{d_c - d_b}{d_c} \right) \times 100$$

em que d_b e d_c são as densidades bruta e de compactação dos extratos secos, respectivamente. Conforme os valores de Índice de Carr obtidos, o fluxo dos pós foi determinado de acordo com a Tabela 2 como: excelente, bom, favorável a tolerável, ruim/fluido, ruim/coesivo, muito ruim e extremamente ruim.

Tabela 2. Relação entre fluidez e índice de Carr.

Tipo de fluxo	Índice de Carr (%)
Excelente	5 – 12
Bom	12 – 18
Favorável a tolerável	18 – 21
Ruim /Fluido	21 – 25
Ruim/Coesivo	25 – 32
Muito ruim	32 – 38
Extremamente ruim	> 38

Fonte: AULTON et al., 2005.

O Fator de Hausner (FH) foi obtido através do quociente entre as densidades de compactação (d_c) e bruta (d_b) dos extratos secos de *H. pluvialis*, conforme a equação 7:

Equação 7

$$FH = \frac{d_c}{d_b}$$

Conforme postulado por Hausner, valores menores que 1,25 indicam bom fluxo; valores maiores que 1,5 indicam fluxo ruim; valores entre 1,25 e 1,5 exigem a adição de lubrificantes para melhorar o escoamento dos pós, nas diferentes etapas de preparação do medicamento (AULTON et al., 2005).

4.2.3.3.7 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Espectros de absorção no infravermelho foram obtidos usando espectrofotômetro FT-IR Shimadzu (Kyoto, Japão). Discos de brometo de potássio (KBr) contendo os extratos secos de *H. pluvialis*, astaxantina ou dióxido de silício coloidal foram preparados e as leituras das amostras foram efetuadas entre 4000 e 400 cm^{-1} .

4.2.3.3.8 Análise térmica

O comportamento térmico dos extratos secos foi avaliado por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TG). As análises de DSC foram realizadas utilizando um equipamento DSC60 Shimadzu (Shimadzu, Kyoto, Japão). Cerca de 2 mg das amostras foram pesados em placas de alumínio, as quais foram lacradas e submetidas ao aquecimento até 900 °C, numa razão de 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio. Uma placa de alumínio vazia lacrada foi utilizada como referência.

As análises termogravimétricas dos extratos secos de *H. pluvialis* foram realizadas em termobalança TGA-50 (Shimadzu) sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de 50 mL/min. Cerca de 5 mg de amostra foram utilizadas na análise em cadinho de platina. A razão de aquecimento foi de 10 °C/min até 300 °C.

4.2.3.3.9 Determinação de carotenoides totais

A determinação dos carotenoides totais (CT) nos extratos secos foi realizada por método espectrofotométrico. Cerca de 0,1 g de cada um dos extratos secos foram pesados e transferidos para balões volumétricos de 25,0 mL e o volume

foi completado com acetona. As misturas resultantes foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado e analisado em espectrofotômetro UV/VIS (Shimadzu, Japão), em comprimento de onda de 460 nm, usando acetona como branco. O teor de carotenoides totais no extrato seco (g/100 g) foi calculado conforme a equação 8:

Equação 8

$$CT = \frac{A \times 3 \times 25}{\varepsilon \times m \times 100}$$

Em que A é a absorbância da amostra, ε é o coeficiente de extinção específica da astaxantina em acetona ou 2198 (100 mL g⁻¹ cm⁻¹) e m é a massa de extrato seco pesada. As análises foram realizadas em triplicata. O efeito dos parâmetros de secagem (temperatura e concentração de dióxido de silício coloidal) sobre o teor de carotenoides totais foi avaliado estatisticamente pela ANOVA de dois fatores, seguida do teste de Tukey de comparação entre as médias para um nível de significância de 5%.

4.2.3.3.10 Determinação da astaxantina por CLAE

A análise quantitativa da astaxantina no extrato secos de *H. pluvialis* foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa conforme condições

cromatográficas descritas em 4.2.2.2.4. Para tal, cerca de 10 mg de extrato seco de *H. pluvialis*, exatamente pesados, foram transferidos para um tubo eppendorf envolvidos com papel alumínio, aos quais foram adicionados 1,0 mL de metanol acidificado. As amostras foram mantidas sob agitação durante 1 h, protegidas da luz e em temperatura ambiente. Após, as amostras foram centrifugadas (Centrífuga Novatécnica® NT 810) a 5000 rpm durante 10 min. Os sobrenadantes foram coletados, filtrados e injetados no cromatógrafo. O teor de astaxantina foi calculado com base em uma curva padrão ($y = 44231,56364 x$, $R^2 = 0,99024$) de astaxantina (Sigma, 98%), sendo considerada a média de três injeções sequenciais por amostra. O efeito dos parâmetros de secagem (temperatura e concentração de dióxido de silício coloidal) sobre o teor de astaxantina foi avaliado estatisticamente pela ANOVA de dois fatores, seguida do teste de Tukey de comparação entre as médias para um nível de significância de 5%.

4.2.3.3.12 Avaliação do perfil de dissolução dos carotenoides totais a partir dos extratos secos

O perfil de dissolução dos carotenoides totais a partir dos extratos secos de *H. pluvialis* foi avaliado em aparelho de

dissolução Nova Ética 299, acoplado ao aparato USP II (pá) confirmar, contendo 200 mL de solução aquosa de lauril sulfato de sódio 0,5% (m/V), e mantido sob agitação constante a 75 rpm e temperatura de 37°C. Para os ensaios, 200mg de extrato seco foram colocados em cápsulas de gelatina dura, sendo observado a manutenção das condições *sink*. Em intervalos de tempo pré-determinados alíquotas de 5 mL do meio de dissolução foram coletadas e analisadas quanto ao teor de carotenoides totais por metodologia de espectrofotometria de absorção no comprimento de onda de 460 nm. Após cada coleta, o volume removido foi repostado com o meio de dissolução fresco. A precisão do método analítico (repetibilidade) foi determinada pela análise de seis amostras e expressa por meio do desvio padrão relativo (DPR%) (BRASIL, 2003). A partir dos resultados, curvas de percentual de carotenoides totais liberado *versus* tempo (min) foram construídas. A eficiência de dissolução (ED%) foi estimada através da seguinte equação 9:

Equação 9

$$ED(\%) = \frac{ASC}{ATR} \times 100$$

ASC é a área sob a curva do perfil de dissolução calculada pelo método trapezoidal e ATR é a área total do retângulo, definido pela ordenada (100% de dissolução). O efeito dos parâmetros

de secagem (temperatura e concentração de dióxido de silício coloidal) sobre os valores de ED% foi avaliado pela ANOVA de dois fatores, seguida do teste de Tukey de comparação entre as médias para um nível de significância de 5%.

4.2.4 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* da biomassa, SEHP e dos extratos secos pelo método do DPPH

A capacidade da biomassa de *H. pluvialis* em sequestrar o radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH) foi avaliada conforme método descrito por Chen e colaboradores (2009). Para isso uma alíquota de 290 µL da solução metanólica de DPPH 0,1 mM foi adicionada a 10 µL da SEHP e das soluções obtidas a partir dos extratos secos na concentração de 10 mg/mL. As misturas foram agitadas e a placa foi deixada em repouso e ao abrigo da luz por 30 min. Posteriormente, a absorbância das amostras foi medida usando leitora de Elisa Automatica (TermoPlate®) a 530 nm. O resultado final foi expresso em percentual de inibição, calculado de acordo com a equação 10:

Equação 10

$$\% \text{ de inibição} = \frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \times 100$$

$Abs_{controle}$ é a absorbância obtida para o controle (solução de DPPH sem antioxidante) e $Abs_{amostra}$ é a absorbância obtidas após leitura das amostras, na presença do DPPH.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE *H. PLUVIALIS*

Microalgas atualmente apresentam grande potencial de utilização nos setores industriais devido à capacidade em produzir biomassa rica em compostos biologicamente ativos como carotenoides, além do fato de serem micro-organismos que apresentam taxa de crescimento rápido e são facilmente cultivados (MENDONÇA et al., 2013). Entretanto, para obtenção dos carotenoides é necessário fazer uso de processos extrativos que podem ser afetados por inúmeras variáveis, incluindo as características químicas e físicoquímicas do material de partida. Assim, a biomassa de *H. pluvialis* foi caracterizada como etapa prévia à extração quanto ao teor de umidade, tamanho de partícula e distribuição granulométrica. Os resultados são mostrados Tabela 3.

Tabela 3. Resultados obtidos na caracterização de teor de umidade e tamanho da biomassa de *H. pluvialis*.

Amostra	Teor de umidade (% m/m)	Tamanho de partícula (µm)				
		d _{10%}	d _{50%}	d _{90%}	d _{4,3}	Span
Biomassa	8,09 ± 1,18	17,05	58,53	214,68	94,72	3,37

O teor de umidade da biomassa é uma importante característica a ser avaliada, uma vez que a presença de água afeta fortemente a estabilidade química e microbiológica, assim como as características físicas e os processos tecnológicos envolvidos na produção (SILVA et al., 2008). Este parâmetro pode também fornecer dados acerca do rendimento da extração, já que a secagem afeta o estado de integridade das estruturas celulares, expondo-as mais ou menos ao contato com solventes. Além do ponto de vista tecnológico e de produção, é importante conhecer quantitativamente, o conteúdo de água presente na matéria-prima para que esses valores sejam considerados nos cálculos de rendimento (DE PAULA, 1996). A média da porcentagem de perda por dessecação do pó da biomassa foi de $8,09 \pm 1,18\%$ (m/m), o qual se encontra na faixa de valores aceitável por diferentes farmacopeias para matérias-primas vegetais, que é entre 8 e 14% (SHARAPIN, 2000).

A Figura 9 apresenta o perfil de distribuição granulométrica da biomassa de *H. pluvialis* obtido pela técnica de difração a laser, o qual exibiu perfil monomodal. Conforme mostrado na Tabela 3, as partículas da biomassa de *H. pluvialis* apresentaram valores médios de $d_{50\%}$ (diâmetro de partícula

correspondente a 50% da distribuição acumulada) de 58,53 μm e diâmetro médio em volume (diâmetro correspondente a uma esfera de igual volume) de 94,72 μm .

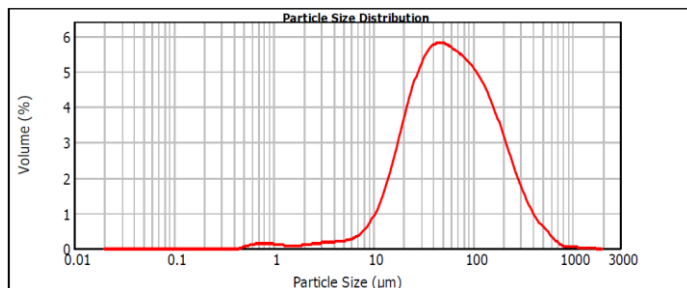


Figura 9. Perfil de distribuição granulométrica da biomassa de *H. pluvialis*.

As fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da biomassa de *H. pluvialis* podem ser observadas na Figura 10. As partículas da biomassa apresentaram superfície rugosa e formato esférico, com tamanhos de algumas dezenas de micrômetros, estando de acordo com os resultados obtidos pela técnica de difração a laser.

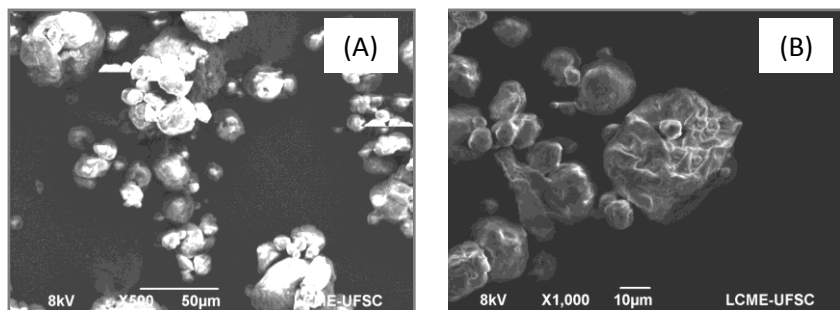


Figura 10. Fotomicrografias da biomassa de *H. pluvialis* obtidas por microscopia eletrônica de varredura com aumentos de (A) 500 e (B) 1000 vezes.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA SOLUÇÃO EXTRATIVA (SEHP) OBTIDA A PARTIR DA BIOMASSA DE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS*

Muitos métodos de extração de carotenoides a partir de materiais biológicos têm sido testados, incluindo a extração por solventes, a extração em fase sólida e a extração por fluidos supercríticos. Dentre estes, a extração com o uso de solventes orgânicos é a que mais tem sido aplicada para extração de carotenoides totais, pois é um método simples e de baixo custo. Independente da técnica empregada, estudos têm mostrado que a extração de carotenoides é altamente afetada pelo tipo de solvente, relação solvente:biomassa, tempo e condições de armazenamento (WANG e LIU, 2009). Neste trabalho o

método clássico de extração de carotenoides descrito por Mezzono e colaboradores (2011) foi utilizado para a preparação da SEHP. A caracterização foi realizada como etapa intermediária para a preparação dos extratos secos e os ensaios realizados foram limitados àqueles frequentemente utilizados em pesquisa tecnológica desta natureza, ou seja, determinação do resíduo seco, pH, densidade, além do teor de carotenoides totais e de astaxantina. Os resultados encontram-se relacionados na Tabela 4.

Tabela 4. Resultados obtidos na caracterização da solução extrativa (SEHP)

Parâmetros analisados	Dados experimentais (Média \pm σ)
Resíduo seco (% m/m)	1,60 \pm 0,02
pH	5,40 \pm 0,12
Densidade (g/mL)	0,99 \pm 0,03
Teor de carotenoides totais (μ g/mL)	82,1 \pm 2,10
Teor de astaxantina (μ g/mL)	8,79 \pm 0,05

A avaliação do resíduo seco da solução extrativa apresentou um teor de sólidos de 1,60% (m/m), o que pode ser considerado baixo. O resíduo seco traduz-se no teor de sólidos dispersos na solução concentrada sendo útil na previsão do rendimento teórico do produto seco produzido. Teoricamente, valores de sólidos em dispersão inferiores a 10% (m/v) podem comprometer o bom rendimento da operação de secagem em

spray dryer, de forma a resultar em partículas de tamanho muito reduzido e assim, atravessando os filtros do sistema de exaustão (LEMOS-SENNA et al., 1997). Ainda, o teor de resíduo sólido presente na amostra possibilita fazer o cálculo do percentual de adjuvantes a ser adicionado na solução extrativa para produção do extrato seco por *spray-drying* (ARARUNA, 2008).

O sistema de ligações duplas conjugadas constitui o cromóforo que fornece aos carotenoides a sua coloração e sua absorção no visível, e serve como base para sua identificação e quantificação (RODRIGUEZ-AMAYA, 2008). É descrito na literatura que a fração de carotenoides da *Haematococcus pluvialis* contém cerca de 70% de monoésteres e 10% de diésteres de astaxantina, e 5% de astaxantina livre, além de β -caroteno, cataxantina e luteína. Vários métodos têm sido usados para a determinação destes carotenoides, incluindo métodos espectrofotométricos e de cromatografia líquida, sendo que os primeiros apresentam as vantagens de serem mais rápidos e de baixo custo, uma vez que o teor pode ser estimado sem requerer a separação e/ou tratamento prévio da amostra.

A Figura 11 mostra o espectro padrão de absorção de astaxantina no comprimento de onda de 400 a 600 nm e na Figura 12 o espectro de absorção da SEHP.

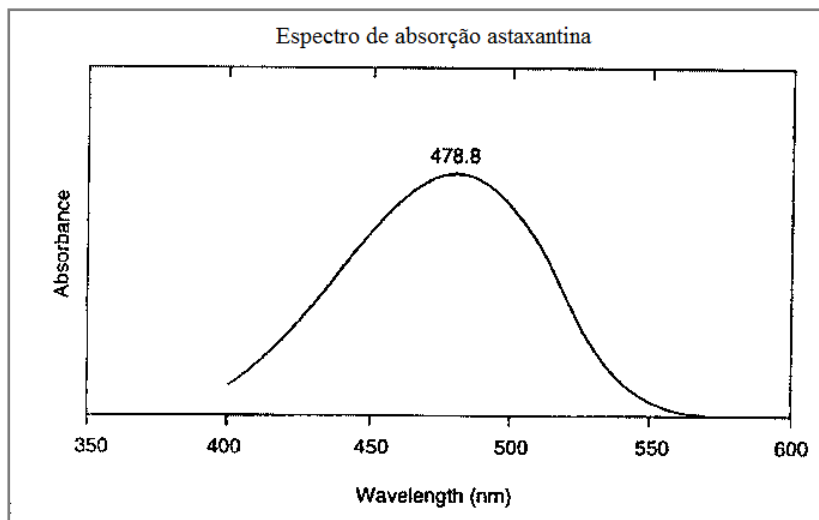


Figura 11. Espectro de absorção no UV e visível da astaxantina padrão.

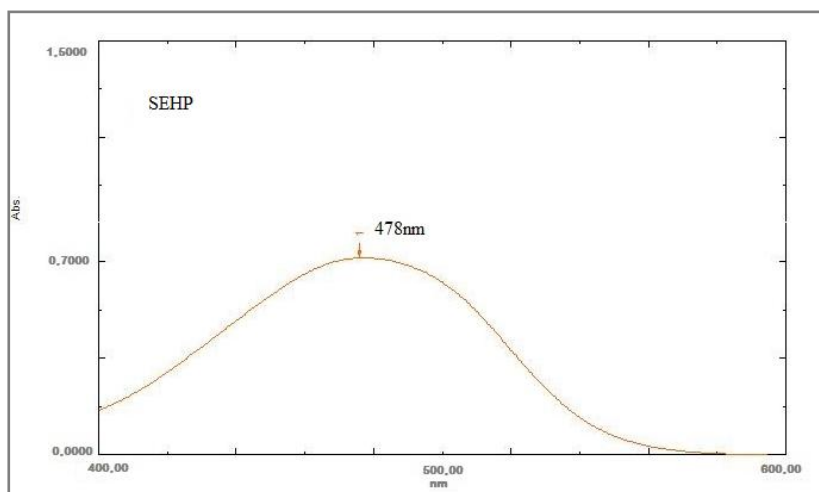


Figura 12. Espectro de varredura da SEHP na faixa de comprimento de onda de 400 nm a 600 nm.

Como pode ser observado no espectro de absorção da SEPH (Figura 12), não houve interferência da clorofila no doseamento dos carotenoides totais. Assim, neste estudo, o teor de carotenoide totais foi determinado de acordo com a lei Lambert-Beer e o valor encontrado foi de $82,1 \pm 2,1 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 4). Considerando o volume de solução extrativa obtida (800 mL) e a massa de biomassa utilizada (5 g), a massa total extraída de carotenoides totais foi de 65,68 mg ou 13,14 mg/g de biomassa. Este valor foi mais baixo que aqueles encontrados por Passos e colaboradores (2007), em um estudo que visava avaliar o efeito do tipo de solvente extrator sobre o teor de carotenoides de *H. pluvialis*.

A quantificação de astaxantina nos extratos de *H. pluvialis* (Figura 13) tem sido considerada um desafio e muitas vezes somente uma estimativa pode ser obtida. A *Haematococcus* produz astaxantina principalmente na forma de ésteres, cujos padrões não são disponíveis para calibração do método. Muitos métodos têm proposto a hidrólise enzimática dos ésteres para determinação da astaxantina total. Entretanto, estas reações podem levar a degradação parcial da astaxantina, levando à obtenção de valores mais baixos do que os reais. Então neste trabalho foi avaliada unicamente o teor de astaxantina livre (AST) nas amostras (SEHP e ES). O método utilizado na quantificação foi aquele desenvolvido no

Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal no Centro de Ciências Agrárias da UFSC.

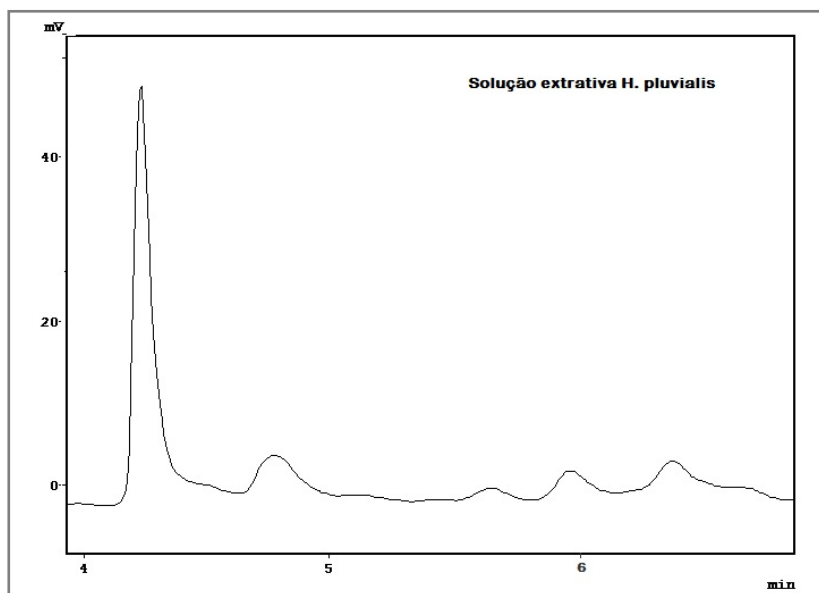


Figura 13. Cromatograma obtidos nas análises de astaxantina na SEHP por CLAE. O tempo de retenção da astaxantina foi de 4,4 minutos.

5.3 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS SECOS DE *HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS* POR SECAGEM EM TORRE DE ASPERSÃO (*SPRAY DRYING*)

5.3.1 Caracterização do adjuvante dióxido de silício coloidal (Aerosil® 200)

A secagem é uma das operações mais frequentes na produção de medicamentos, sendo usada para obtenção de pós e grânulos, que podem ainda serem processados para gerar outras formas farmacêuticas sólidas, como as cápsulas e os comprimidos (OLIVEIRA, PETROVICK, 2009). A remoção da água proporciona um aumento na estabilidade química, físico-química e microbiológica, aumentando assim a vida útil do produto final. A secagem em torre de aspersão tem sido empregada para a secagem de inúmeras soluções extrativas vegetais, pois é um processo rápido, facilmente escalonável, e permite a obtenção de pós secos com boas características físico-químicas e elevado rendimento (MASTERS, 1985). Entretanto, o sucesso da operação de secagem depende das características físicas e químicas do material a ser seco e das condições de processamento. Em geral, materiais de partida ricos em açúcares e ácidos de baixo peso molecular conduzem à obtenção de pós muito higroscópicos, suscetíveis à aglomeração e com problemas de fluidez, que muitas vezes podem se aderir à torre de secagem, levando ao baixo rendimento da operação (BHANDARI et al.,1997). Estes problemas têm sido contornados pela adição de adjuvantes de

secagem. Os mais comumente empregados são: amido, ciclodextrinas, dióxido de silício coloidal, fosfato tricálcico, gelatina, goma arábica, lactose, maltodextrinas, entre outros (OLIVEIRA e PETROVICK, 2009).

Ensaio preliminares levaram à seleção do dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. De acordo com a USP 30, o dióxido de silício coloidal é uma sílica pirogênica, submicroscópica obtida a partir de uma hidrólise em chama a 1.000°C, contendo não menos que 99% e não mais que 100,5% de SiO₂. O tamanho destas partículas é em torno de 12 nm e o pH de uma dispersão na concentração 10% varia entre 3,5-5,5 (USP, 2007). É um pó fino, branco, amorfo, inodoro e insípido (VILLANOVA, SÁ, 2007). Apresenta elevada superfície específica e alto poder sorvente, tendo sido amplamente empregado na obtenção de produtos secos por aspersão a partir de soluções extrativas de diferentes espécies vegetais (OLIVEIRA, PETROVICK, 2009). O pequeno tamanho da partícula e a grande superfície de contato fazem ainda com que o dióxido de silício coloidal forneça boas propriedades de fluxos aos pós (VILLANOVA, SÁ, 2007).

A caracterização do dióxido de silício coloidal foi realizada conforme descrito em 4.2.3.2. Os resultados obtidos na determinação da perda por dessecação e do pH são

mostrados na Tabela 5. A fotomicrografia obtida por MEV para avaliação da morfologia é mostrada na Figura 14.

Tabela 5. Resultados obtidos na caracterização do dióxido de silício coloidal (Aerosil[®] 200).

Ensaio	Resultado	Especificação (THE UNITED, 2007)
Perda por dessecação (%)	$1,83 \pm 0,16$	< 2,5
pH	$4,22 \pm 1,71$	3,5 – 5,5

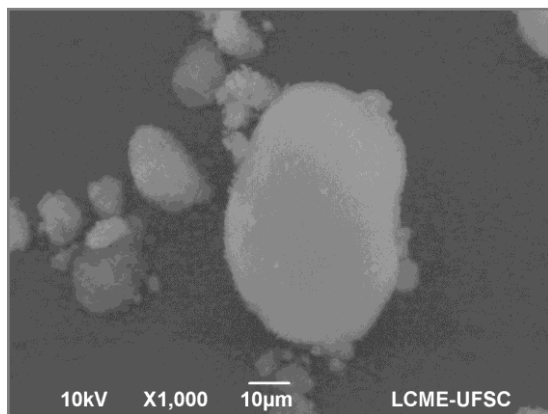


Figura 14. Fotomicrografia do dióxido de silício coloidal obtida por microscopia eletrônica de varredura com aumento de 1000x

Os resultados da avaliação da qualidade do adjuvante de secagem Aerosil[®] encontram-se dentro dos limites especificados pela Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2007). A observação morfológica revelou a presença de partículas de formato irregular, superfície rugosa e tamanho de

alguns micrômetros, estando de acordo com as características observadas por outros autores (DOMINGUES et al., 2008).

5.3.2 Preparação e caracterização dos extratos secos

5.3.2.1 Avaliação dos parâmetros de secagem sobre as características químicas e físico-químicas dos extratos secos

5.3.2.1.1 Rendimento e teor de umidade

Vários fatores afetam a secagem por *spray-drying*, incluindo as características do material a ser seco e os parâmetros do processo. Dentre eles, a concentração de sólidos presentes no líquido de alimentação exerce grande impacto sobre a eficiência da operação de secagem. O teor de sólidos que permita a obtenção de um produto com características desejáveis deve ser otimizado, visto que este pode impactar no custo do processo. Em geral, a operação deve ser realizada com o máximo teor de sólidos possível, possibilitando uma utilização adequada do calor. Baixas concentrações de sólidos necessitam que grande quantidade de solvente seja eliminada e,

portanto, requerem uma maior quantidade de calor para a secagem (MASTERS, 1985). Em relação ao processo, um dos parâmetros mais importantes é a temperatura do ar de entrada, sendo determinante na qualidade do produto obtido. O aumento na temperatura do material de entrada facilita o processo de secagem, pois normalmente reduz a tensão superficial e a viscosidade, facilitando a formação de gotículas (OLIVEIRA, PETROVICK, 2009). Assim, neste trabalho foi avaliado o efeito da concentração de dióxido de silício coloidal (2%, 4% e 6%) e temperatura de entrada (150°C e 175°C), sobre as características físico-químicas dos extratos secos. Os resultados obtidos na determinação do rendimento da operação e teor de umidade estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados de rendimento e teor de umidade dos extratos secos em função das condições de secagem (n = 3).

	Aerosil 200 (%) ¹	Temperatura de entrada (°C)	Rendimento (%, $M \pm \sigma$)	Teor de umidade (%, $M \pm \sigma$)
ES1	2	150	87,8 \pm 0,01	1,8 \pm 0,19
ES2	4	150	88,9 \pm 0,02	1,6 \pm 0,04
ES3	6	150	88,0 \pm 0,06	1,4 \pm 0,20
ES4	2	175	94,6 \pm 0,04	1,4 \pm 0,20
ES5	4	175	93,3 \pm 0,30	1,2 \pm 0,20
ES6	6	175	94,0 \pm 0,35	1,0 \pm 0,13

¹Calculado em relação ao volume de SEHP.

Como é possível observar na Tabela 6, os valores de rendimento de secagem variaram entre 87,8 e 94,6%, sendo

que foram maiores quando a maior temperatura de secagem foi utilizada. A análise estatística evidenciou que o rendimento é afetado unicamente pela temperatura de entrada do *spray-dryer* ($P < 0,001$), mas não pela concentração de Aerosil[®]. O teor de umidade variou entre 1,0 e 1,8% (m/m) e foi afetado por ambos os parâmetros de secagem avaliados.

Os resultados observados neste trabalho são semelhantes aos encontrados por outros autores. A influência dos parâmetros de temperatura de entrada e concentração de dióxido de silício coloidal (Aerosil[®] 200) sobre as características de produtos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* (aroeira vermelha) foi investigada por Vasconcelos e colaboradores (2005). Os resultados do estudo revelaram que o rendimento do processo aumentou nos níveis mais altos de Aerosil[®]. Na concentração de 30% obtiveram os menores valores para a umidade residual, independentemente da temperatura de entrada. A higroscopicidade e a umidade residual dos produtos foram inversamente proporcionais ao aumento da temperatura de entrada e à concentração do adjuvante. Similarmente, estudos mostraram que o teor de umidade do tomate em pó (GOULA et al., 2005), pó de suco de laranja (CHEGINI, GHOBADIAN, 2005), suco de cacto de pera em pó (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ et al., 2005) e

cenoura preta em pó (ERSUS, YURDAGEL, 2007) diminuiu com o aumento da temperatura de secagem.

5.3.2.1.2 Tamanho de partícula

A distribuição de tamanho de partícula é uma das características mais importantes de um sistema de pó ou de partículas, pois afeta tanto as propriedades como o desempenho dos produtos intermediários e finais (BRITTON, 1995). Certas propriedades químicas e físicas dos fármacos são afetadas pelo tamanho, forma e morfologia da superfície da partícula, assim como a homogeneidade da formulação, velocidade de dissolução e biodisponibilidade. Além disso, as propriedades de fluxo estão diretamente relacionadas ao tamanho de partícula (MASTERS, 1985; CHAN, et al., 2007).

A distribuição granulométrica dos extratos secos de *H. pluvialis* foi determinada por difratometria a laser, conforme descrito em 4.2.3.3.3. A Figura 15 exibe os gráficos de distribuição de tamanho das partículas dos extratos secos de *H. pluvialis* obtidos nas diferentes condições testadas. Na tabela 7 estão dispostos os valores tamanho a 10% ($d_{10\%}$), 50% ($d_{50\%}$) e 90% ($d_{90\%}$) da distribuição acumulada, assim como o diâmetro médio ($d_{4,3}$) e de *Span* de todas as formulações.

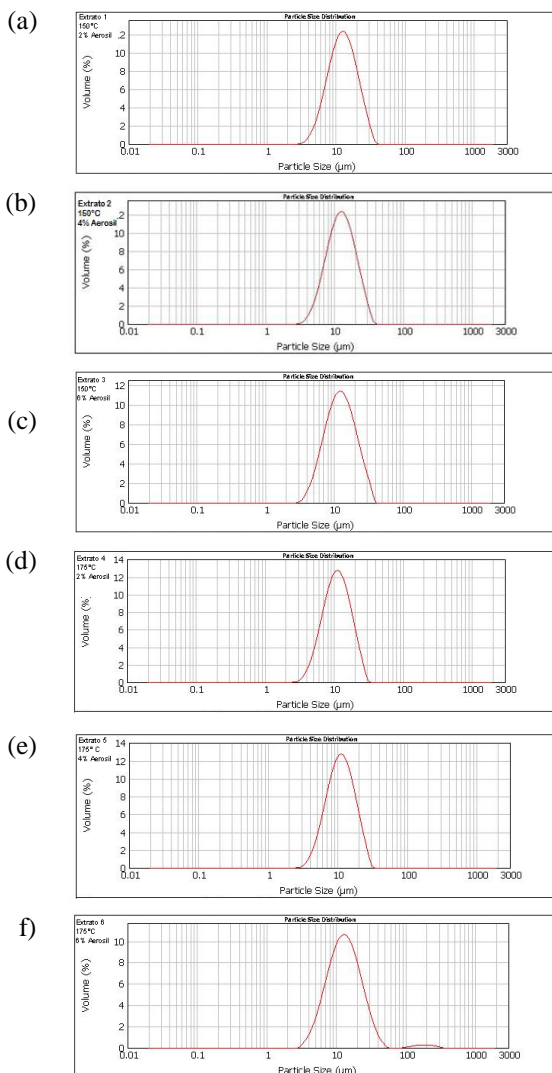


Figura 15. Gráfico de distribuição de tamanho das partículas dos extratos secos de *H. pluvialis*: (a) ES1, (b) ES2, (c) ES3, (d) ES4, (e) ES5, (f) ES6.

Tabela 7. Tamanho de partícula e distribuição granulométrica dos extratos secos de *H. pluvialis*.

Extrato	$d_{10\%} \pm \sigma$ (μm)	$d_{50\%} \pm \sigma$ (μm)	$d_{90\%} \pm \sigma$ (μm)	$d_{4,3} \pm \sigma$ (μm)	Span $\pm \sigma$
ES1	$6,65 \pm 0,11$	$12,50 \pm 0,01$	$22,89 \pm 0,39$	$13,78 \pm 0,07$	$1,29 \pm 0,04$
ES2	$6,44 \pm 0,15$	$11,86 \pm 0,47$	$22,77 \pm 0,76$	$13,62 \pm 0,19$	$1,35 \pm 0,06$
ES3	$6,49 \pm 0,15$	$11,86 \pm 0,56$	$22,28 \pm 0,89$	$13,41 \pm 0,27$	$1,32 \pm 0,06$
ES4	$6,41 \pm 0,10$	$12,29 \pm 0,86$	$23,82 \pm 0,80$	$14,35 \pm 0,27$	$1,45 \pm 0,07$
ES5	$6,01 \pm 0,03$	$11,06 \pm 0,10$	$22,73 \pm 0,34$	$14,08 \pm 0,15$	$1,25 \pm 0,03$
ES6	$6,36 \pm 0,01$	$12,93 \pm 0,06$	$23,38 \pm 0,61$	$14,84 \pm 1,33$	$1,54 \pm 0,03$

Na tabela: $d_{10\%}$, $d_{50\%}$ e $d_{90\%}$ referem-se ao diâmetro da partícula correspondente a 10%, 50% e 90% da distribuição acumulada e $d_{4,3}$ corresponde ao diâmetro médio equivalente a uma esfera de igual volume.

Como é possível observar na Figura 15, os extratos secos exibiram perfis de distribuição granulométrica bastante similares, todos apresentando distribuição monomodal. O diâmetro médio das partículas ($d_{4,3}$) variou entre 13,41 e 14,84 μm e os valores de span foram baixos, variando entre 1,25 e 1,54 (Tabela 7). Os valores de *Span*, que fornecem um indicativo da amplitude da distribuição granulométrica, indicaram uma estreita distribuição de tamanho, uma vez que quanto menores eles são, mais estreita é a distribuição (TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007). Este resultado pode estar relacionado com a baixa viscosidade das misturas de adjuvante e solução extrativa. Como o mesmo adjuvante de

secagem foi utilizado para todas as formulações, provavelmente as diferentes concentrações utilizadas não foram capazes de modificar as características do líquido de alimentação e, portanto, do perfil da distribuição de tamanho de partícula.

5.3.2.1.3 Avaliação da morfologia

As fotomicrografias dos extratos secos de *H. pluvialis* são mostradas nas Figuras 16 e 17. A análise por microscopia eletrônica de varredura demonstra que os extratos secos de *H. pluvialis* apresentaram formato esférico e superfície lisa, característico de pós produzidos pelo processo de secagem por aspersão, sem a presença de poros superficiais. As partículas exibiram tamanhos de alguns micrometros, estando de acordo com os resultados obtidos pela técnica de difração a laser.

Nijdam e colaboradores (2006) observaram a formação de partículas mais rígidas com a utilização de temperaturas mais elevadas, na produção de partículas de leite em pó por *spray-drying*. De acordo com estes autores, quando a temperatura é suficientemente alta, a umidade evapora rapidamente e a superfície se torna seca e dura, de modo que as partículas não murcham. No entanto, quando a temperatura de

secagem é mais baixa, a superfície das partículas permanece úmida e flexível por mais tempo e, dessa forma, as partículas podem ficar murchas e enrugadas, quando resfriadas.

Outro fator importante a ser considerado, é a viscosidade do líquido de alimentação, que está relacionado com a concentração de sólidos, pois esta interfere na formação de gotas esféricas. De modo geral, menos energia ou menor pressão são aplicadas quando a viscosidade é mais baixa (SOARES, 2002).

Neste estudo, não foram observadas diferenças na morfologia das partículas quando as diferentes condições de secagem foram testadas, sugerindo que nem a temperatura de entrada, nem a concentração de dióxido de silício coloidal provocou mudanças nas características do líquido de alimentação e/ou no processo de secagem que resultassem em alterações na estrutura das partículas.

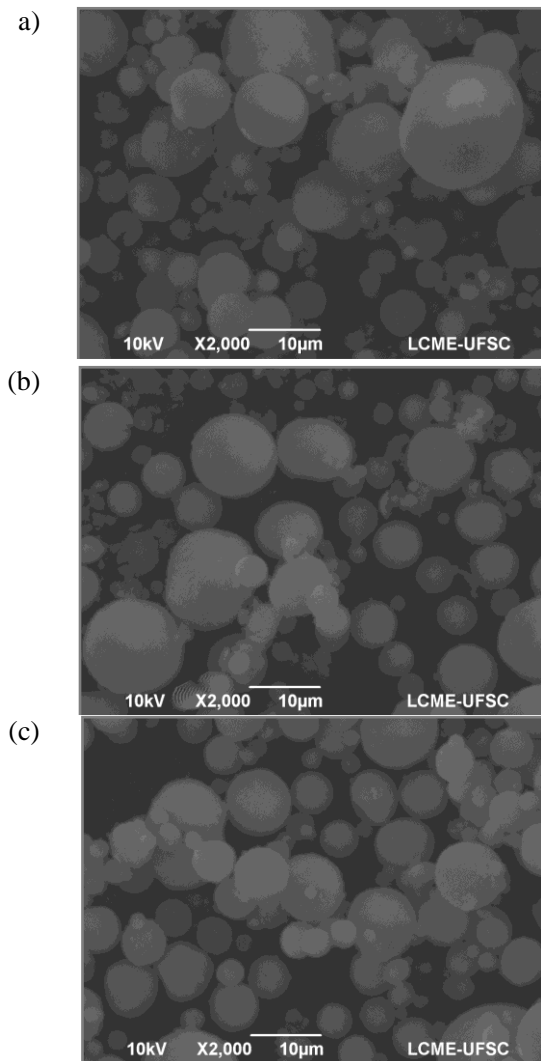


Figura 16. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos extratos secos *Haematococcus pluvialis*, preparados usando temperatura de entrada de 150 °C e (a) 2%, (b) 4% e (c) 6% de dióxido de silício coloidal.

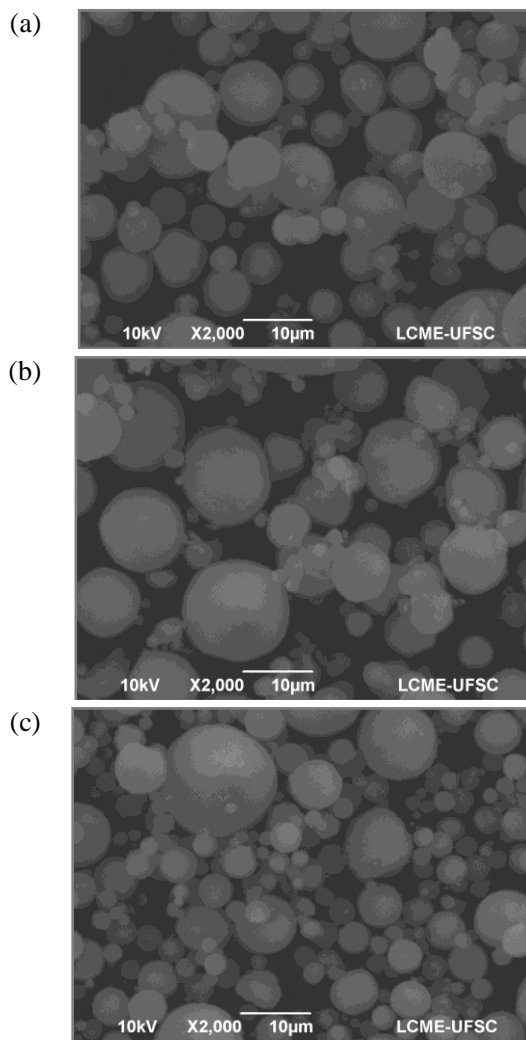


Figura 17. Fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos extratos secos *Haematococcus pluvialis*, preparados usando temperatura de entrada de 175 °C e (a) 2%, (b) 4% e (c) 6% de dióxido de silício coloidal.

5.3.2.1.4 Determinação da densidade aparente e de compactação

Na secagem em torre de aspersão, a influência do teor de sólidos no material de partida também é refletida na densidade do produto final. De acordo com Cao e colaboradores (2000), o aumento no conteúdo de sólidos, eleva a viscosidade, resultando em pós mais densos. Por outro lado, quanto menor o conteúdo de sólidos em uma suspensão, maior o espaço oco interno da partícula, com formação de partículas com paredes menos espessas e menos densas (OLIVEIRA, PETROVICK, 2009).

A densidade de um pó está diretamente ligada à estrutura das partículas e, conseqüentemente, à capacidade de fluxo e compressão. Representa um parâmetro importante na etapa de desenvolvimento de uma formulação, porém, não há uma escala para determinação dos limites (VALENTE, 2010). Os valores das densidades aparente e de compactação foram obtidos conforme descrito em 4.2.3.3.5 e os resultados estão demonstrados na Tabela 8. Os valores de densidade aparente e compactada dos extratos secos ficaram em torno de 0,11 e 0,12 g/mL, respectivamente, e não parecem ter sido afetados pelas condições de secagem testadas.

Tabela 8. Valores de densidade aparente e de compactação dos extratos secos de *H. pluvialis* (n=3).

Extrato	Densidade aparente (g/mL, $M \pm \sigma$)	Densidade compactada (g/mL, $M \pm \sigma$)
ES1	0,110 \pm 0,002	0,132 \pm 0,001
ES2	0,107 \pm 0,002	0,125 \pm 0,002
ES3	0,104 \pm 0,003	0,124 \pm 0,003
ES4	0,113 \pm 0,004	0,125 \pm 0,004
ES5	0,125 \pm 0,004	0,139 \pm 0,001
ES6	0,113 \pm 0,003	0,126 \pm 0,003

5.3.2.1.5 Avaliação das propriedades de fluxo

Pós com fins medicinais devem apresentar boa fluidez para serem empregados na produção de formas sólidas. Com base na densidade aparente e de compactação dos extratos foram determinados os valores de índice de Carr (IC) e do Fator de Hausner (FH), os quais estão relacionados com o comportamento do pó frente ao fluxo e compressão. Os resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de índice de Carr e fator de Hausner, e classificação da fluidez dos extratos secos de *H. pluvialis*

Extrato	Índice de Carr		Fator de Hausner
	(%, $M \pm \sigma$)	Fluidez	
ES1	$15,38 \pm 0,03$	Bom	$1,20 \pm 0,02$
ES2	$14,40 \pm 0,01$	Bom	$1,16 \pm 0,04$
ES3	$16,12 \pm 0,02$	Bom	$1,19 \pm 0,05$
ES4	$10,61 \pm 0,01$	Excelente	$1,10 \pm 0,01$
ES5	$10,07 \pm 0,02$	Excelente	$1,11 \pm 0,03$
ES6	$10,31 \pm 0,04$	Excelente	$1,20 \pm 0,02$

Os valores do índice de *Carr* variaram entre 14,40 e 16,12%, e entre 10,07 e 10,61% para os extratos preparados com temperatura de entrada de 150° C e 175° C, respectivamente, classificando os pós como tendo fluxo bom a excelente.

O fator de *Hausner* está relacionado ao atrito das partículas e, como tal, também pode ser utilizado para prever propriedades de fluxo do sistema particulado. Valores de fator de *Hausner* superiores a 1,25 indicam pós com pobres características de fluxo. Portanto, os valores encontrados para os extratos secos também evidenciam que estes apresentam boas propriedades de fluxo. Esta característica está associada à utilização do dióxido de silício coloidal como adjuvante de secagem. Ambike e colaboradores (2005) igualmente relataram que o Aerosil® apresenta papel significativo na melhoria das

propriedades de fluxo de dispersões sólidas de sinvastatina obtidas por *spray-drying*.

5.3.2.1.6 Espectroscopia de absorção no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os extratos secos de *H. pluvialis* foram caracterizados por espectroscopia de absorção no infravermelho. Os resultados são mostrados na Figura 18. O espectro de infravermelho da astaxantina padrão mostrou bandas características em concordância com o reportado anteriormente (YUAN et al., 2011). Estas incluem uma forte banda a 1654 cm^{-1} correspondente ao estiramento C=O, uma banda em 1550 cm^{-1} referente ao estiramento C=C do anel, e uma banda na região 3450 cm^{-1} corresponde ao estiramento O-H. Estiramentos na região 3010 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} correspondem à presença da cadeia isoprenoide. O espectro do dióxido de silício coloidal apresentou apenas uma banda intensa na região próxima a 1000 cm^{-1} que está relacionada à ligação Si-O (SILVERSTEIN et al., 2006).

Os espectros obtidos na análise dos extratos secos revelaram a presença das bandas características da astaxantina

em 3450 cm^{-1} , em 3010 cm^{-1} , 2925 cm^{-1} e 2854 cm^{-1} e em cerca de 1600 cm^{-1} , assim como a banda característica do dióxido de silício em cerca de 1000 cm^{-1} .

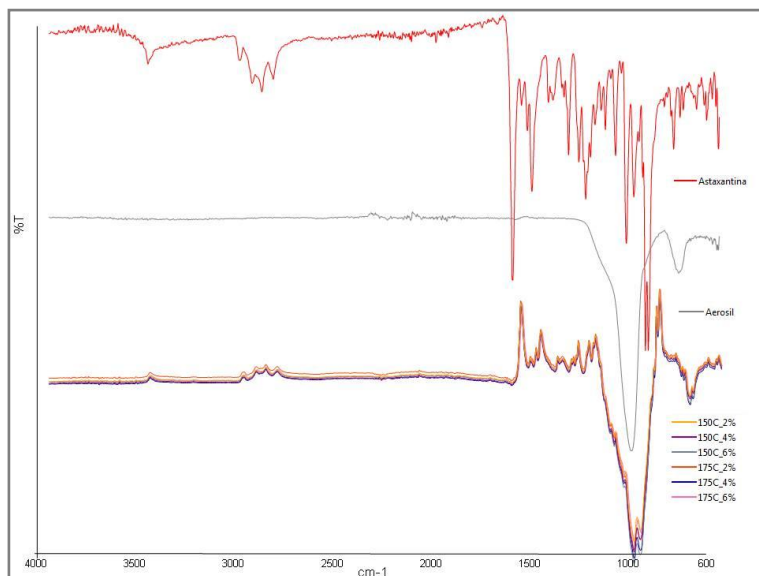


Figura 18. Espectros de infravermelho com transformada de Fourier da astaxantina padrão, dióxido de silício coloidal e dos extratos secos de *H. pluvialis*.

5.3.2.1.7 Análise calorimétrica exploratória diferencial (DSC) e termogravimétrica (TG)

As curvas obtidas na análise por calorimetria exploratória diferencial e termogravimetria dos extratos secos de *H.*

pluvialis e do dióxido de silício coloidal encontram-se mostradas nas Figuras 19 e 20, respectivamente. Como pode ser observado em ambas Figuras, não foi possível visualizar eventos térmicos para os componentes dos extratos secos, sugerindo que tais compostos não encontram-se na forma cristalina nos mesmos.

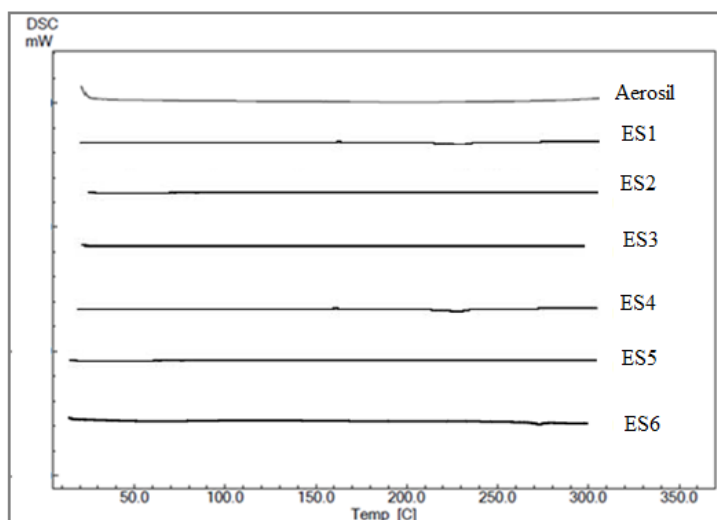


Figura 19. Curvas de DSC obtidas para o dióxido de silício e para os extratos secos de *H. pluvialis*.

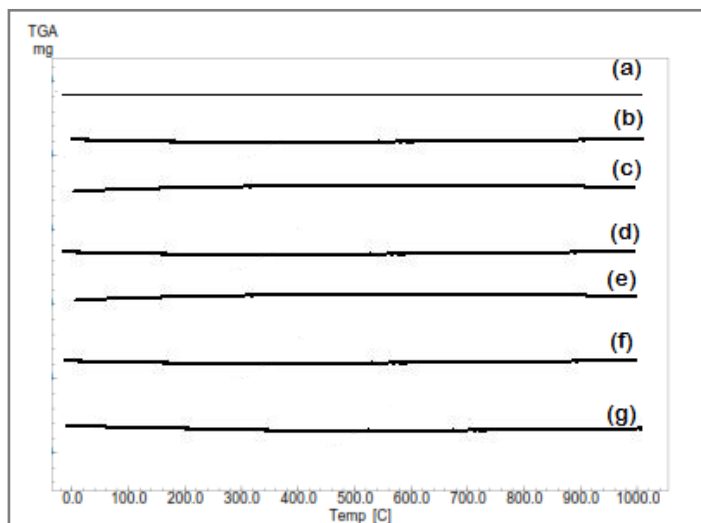


Figura20. Curvas obtidas na análise termogravimétrica do (a) dióxido de silício coloidal e (b-g) e dos extratos secos de *H. pluvialis*. (b) ES1, (c) ES2, (d) ES3, (e) ES4 (f) ES5 (g) ES6.

5.3.2.1.8 Teor de carotenoides totais

Os valores de teor de carotenoides totais dos extratos secos de *H. pluvialis* obtidos em diferentes condições de secagem podem ser visualizados na Tabela 10.

Tabela 10. Teor de carotenoides totais nos extratos secos de *H. pluvialis*.

Extrato seco	Teor de carotenoides totais (g/100g; $M \pm \sigma$)	Recuperação (%, $M \pm \sigma$)
ES1	2,27 \pm 0,006	99,87 \pm 0,009
ES2	1,43 \pm 0,007	98,26 \pm 0,001
ES3	0,79 \pm 0,003	73,70 \pm 0,001
ES4	2,13 \pm 0,066	92,92 \pm 0,009
ES5	1,15 \pm 0,008	79,11 \pm 0,001
ES6	0,73 \pm 0,006	67,87 \pm 0,002

F_{cal} temperatura = 5,15; F_{cal} concentração aerossil = 175,04; F_{crit} = 3,11 (nível de significância = 5%)

A análise estatística evidenciou que tanto a temperatura como a concentração de aerossil afetaram significativamente o teor de carotenoides totais nos extratos secos ($P=0,05$). O extrato ES1 apresentou maior concentração de carotenoides totais, além da maior recuperação do teor em relação à solução extrativa. Observa-se que com o aumento da temperatura e concentração do adjuvante de secagem há redução significativa do teor de carotenoides totais.

A perda de apenas uma parte dos carotenoides pode provavelmente ser explicada pelo fato de que a sensibilidade à temperatura de carotenoides depende da estrutura química específica dos mesmos, com componentes com longa cadeia de duplas ligações conjugadas (tais como β -caroteno) serem mais susceptíveis à temperatura (CHEN,TANG, 1998).

A decomposição térmica e oxidação foram possivelmente os responsáveis por esta diminuição. Ryckebosch e colaboradores (2011) relataram que a microalga *Phaeodactylum tricornutum* secas por *spray-drying* foram mais suscetíveis à degradação do que aquelas secas por liofilização (*freeze-drying*). Por outro lado, apesar das altas temperaturas utilizadas no processo de secagem por *spray-drying*, Leach e colaboradores (1998) relataram uma elevada recuperação de carotenoides após secagem da *Dunaliella salina*. Segundo os autores, a geração de um jato de pulverização atomizado proporciona uma grande área de superfície para rápida evaporação de água. Consequentemente, a temperatura média das gotas é suficientemente baixa, e o tempo de permanência na câmara de secagem das partículas secas é curto o suficiente para que a oxidação excessiva dos carotenoides seja evitada.

De acordo com Goula e Adamopoulos (2005), o aumento da temperatura de entrada do *spray dryer* resultou em maior perda no teor de licopeno no tomate em pó. Similarmente, Quek e colaboradores (2007) observaram uma diminuição do teor de licopeno e β -caroteno na secagem em atomização da melancia com o aumento da temperatura do ar de entrada.

5.3.2.1.9 Teor de astaxantina

O teor de astaxantina nos extratos secos foi realizado conforme descrito em 4.2.3.3.10. O cromatograma de uma das amostras de extrato seco (ES1) encontram-se exibidos na Figura 21. Em ambos cromatogramas, a astaxantina exibiu um tempo de retenção de 4,6 minutos. Os resultados de teor e de recuperação da astaxantina nos extratos secos encontram-se mostrados na Tabela 11.

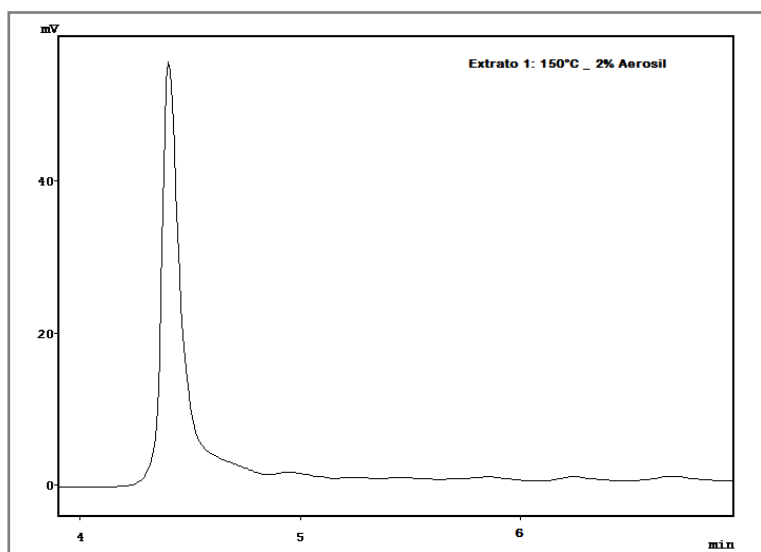


Figura 21. Cromatogramas obtidos após análise do extrato seco de *H. pluvialis* (ES1) por CLAE.

Tabela 11. Teor de astaxantina nos extratos secos de *H. pluvialis*

Extrato	Teor de astaxantina (mg/100 g; M \pm σ)	Recuperação (%) (\square ; M \pm σ)
ES1	76,60 \pm 10,42	33,59 \pm 4,57
ES2	51,70 \pm 3,50	34,40 \pm 2,40
ES3	33,69 \pm 4,20	32,20 \pm 3,89
ES4	30,66 \pm 4,96	13,44 \pm 2,17
ES5	24,94 \pm 4,17	17,08 \pm 2,86
ES6	27,51 \pm 2,06	25,47 \pm 1,91

F_{cal} temperatura = 100,93; F_{cal} concentração aerosil = 26,73; F_{interação} = 19,22, F_{crit} = 3,11 (nível de significância = 5%)

Como pode ser observado na Tabela 11, os valores de teor de astaxantina variaram entre 76,60 e 24,94 mg/100 g de extrato seco. A análise estatística revelou que ambos parâmetros de secagem afetaram significativamente o teor de astaxantina (P = 0,05). Entretanto, diferenças significativas entre as médias foram encontradas quando a concentração de aerosil aumentou, para uma temperatura de entrada de 150° C e quando a temperatura variou de 150 para 175° C, para as duas concentrações de 2 e 6% de aerosil. Para todos os extratos, os valores de recuperação foram baixos, variando entre 13,44 e 34,40%, mostrando que a astaxantina livre é afetada na secagem por *spray-drying*.

5.3.2.1.11 Avaliação do perfil de dissolução de carotenoides totais a partir dos extratos secos de *Haematococcus pluvialis*

No desenvolvimento de formas farmacêuticas, estudos de dissolução são particularmente importantes, pois permitem, por meio de medições *in vitro*, dar indicações sobre o comportamento do fármaco *in vivo*. De forma simplificada, a dissolução pode ser entendida como a liberação de um fármaco da sua forma farmacêutica, tornando-se disponível para absorção pelo organismo. Desta forma, o ensaio de dissolução corresponde a um teste físico, no qual o fármaco passa para a forma solúvel a partir da forma farmacêutica sólida intacta ou dos fragmentos formados durante o ensaio (SANTOS et al., 2011). Ainda, ensaios de dissolução podem ser usados como ferramenta no desenvolvimento de formas farmacêuticas para ajustar e/ou otimizar a formulação e as condições de processamento, de modo a fornecer o máximo de eficácia terapêutica para um dado medicamento. Assim, com o objetivo de avaliar o efeito das condições de secagem sobre o perfil de dissolução de carotenoides totais de *H. pluvialis*, foram realizados os testes de dissolução.

Em ensaios de dissolução, as condições *sink* devem sempre ser respeitadas. Condições *sink* são definidas como aquelas em que não há saturação do meio e a velocidade de liberação é linear, ou seja, não sofre influência da solubilidade dos compostos no meio de dissolução (AULTON, 2005). Como via de regra admite-se que condições *sink* são atingidas

quando a concentração máxima do fármaco no meio de dissolução corresponde a 10% da sua concentração na saturação. Assim, vários meios de dissolução foram previamente testados por meio da adição de quantidades crescentes dos extratos e avaliação visual da solubilização. A partir destes dados, a solução de lauril sulfato de sódio 0,5% (m/V) foi selecionada como médio de dissolução. Os ensaios foram realizados aplicando o método da pá agitadora, seguindo os critérios recomendados pela Farmacopeia Americana (THE UNITED, 2007). Os ensaios foram realizados a 37° C, com a velocidade de agitação a 75 rotações por minuto, sendo analisadas no mínimo seis cápsulas de cada extrato seco de *H. pluvialis*. A leitura espectrofotométrica das absorbâncias foi efetuada em contínuo, durante 60 minutos. As concentrações de carotenoides totais foram calculadas conforme descrito em 4.2.3.3.9. A partir dos resultados, curvas de porcentagem dissolvida (%) *versus* tempo (min) foram construídas. A partir dos perfis de dissolução, os valores de $t_{50\%}$ (tempo para dissolução de 50% de carotenoides totais) e eficiência de dissolução (ED%) foram estimados. Os resultados são mostrados na Figura 22 e Tabela 12, respectivamente.

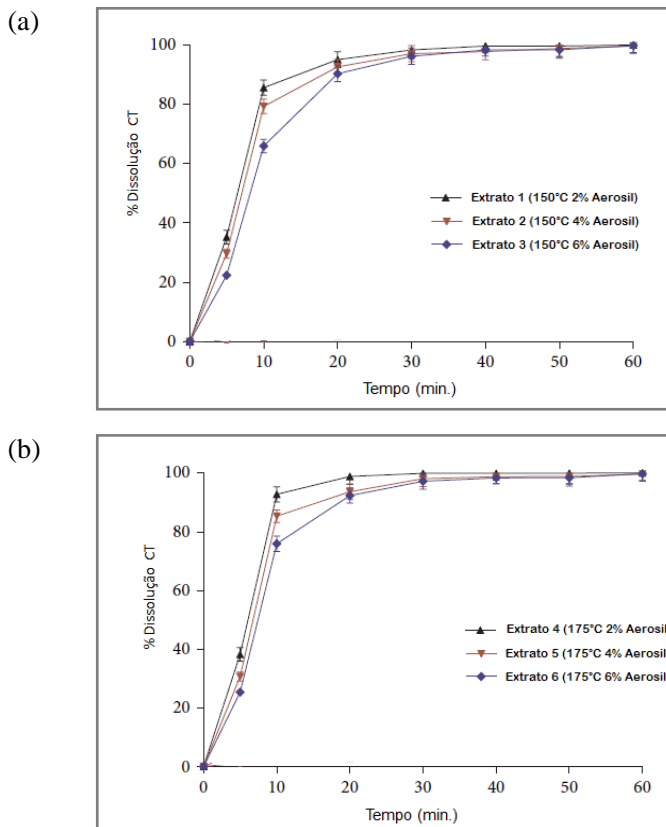


Figura 22. Perfis de dissolução de carotenoides totais a partir dos extratos secos de *H. pluvialis* obtidos usando temperatura de entrada de (a) 150 °C e (b) 175 °C.

Tabela 12. Eficiência de dissolução dos extratos secos de *H. pluvialis*

Extrato seco	ED (%, $M \pm \sigma$)
ES1	82,66 \pm 0,19
ES2	85,0 \pm 0,29
ES3	86,50 \pm 0,28
ES4	83,37 \pm 0,12
ES5	85,25 \pm 0,27
ES6	89,17 \pm 0,28

O teste de dissolução é classificado, segundo sua finalidade, em teste de categoria III (BRASIL, 2003), sendo, portanto, necessário para sua validação a avaliação do parâmetro de precisão por meio da repetibilidade. Após selecionados os parâmetros considerados mais adequados para a realização dos testes, o método de dissolução foi validado através do ensaio de precisão por meio de repetibilidade utilizando cápsulas contendo 200 mg de extrato seco de *H. pluvialis*. Os valores de dissolução de carotenoides totais após 60 minutos variaram entre 82,6 e 89,2%. O valor de desvio padrão relativo foi 2,72%, portanto, inferior a 5%, o que certifica a precisão do método, conforme preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2003).

Como mostrado na Figura 22, o percentual dissolvido acumulado de carotenoides totais após 20 minutos de ensaio variou de 90,35% a 95,06%. A análise da variância realizada

revelou a ausência de diferença significativa entre os valores de eficiência de dissolução para um nível de significância de 5%.

O uso da sílica coloidal pode minimizar a geração carga eletrostática entre os pós com a parede do *spray dryer*, que acarretam no aumento da produtividade bem na melhora das propriedades de fluxo dos pós. Além disso, a sílica também funciona como adsorvente (que oferece elevada área superficial) e desempenha um papel significativo no aprimoramento da solubilidade (PATEL, et.al, 2014). Inúmeros trabalhos de pesquisa também têm sido relatados sobre melhoria na dissolução, rendimento do processo e estabilidade dos extratos após a adição do Aerosil® na solução a ser seca em *spray dryer* (MARTINS, et al., 2011; TAKEUCHI et al., 2005; SHEN et al., 2011).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA BIOMASSA, SOLUÇÃO EXTRATIVA E DOS EXTRATOS SECOS DE *HAEMATOCOCCUS PULVIALIS*

A capacidade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH. Este método é baseado na captura do radical livre estável 1,1 difenil-2-picrilhidrazil por substâncias capazes de doar prótons, levando à formação de sua forma reduzida

(MOLINEUX, 2004). À medida que o DPPH sofre redução, observa-se a mudança da coloração da solução original de violeta intensa para amarela, proporcional à concentração da substância antioxidante em questão. Este ensaio é amplamente utilizado para a medição da capacidade de alimentos e produtos fitofarmacêuticos em sequestrar radicais livres, assim como nas áreas de toxicologia e farmacologia. Os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 13.

Tabela 13. Percentual de atividade antioxidante da biomassa de *H. pluvialis*, da solução extrativa e dos extratos secos de *H. pluvialis*

Amostra (dispersão 10 mg/ml)	Atividade antioxidante (%, $M \pm \sigma$)
Biomassa	$77,83 \pm 0,16$
SEHP	$71,38 \pm 0,25$
ES1	$65,93 \pm 0,05$
ES2	$65,75 \pm 0,08$
ES3	$60,98 \pm 0,06$
ES4	$56,05 \pm 0,03$
ES5	$57,15 \pm 0,03$
ES6	$55,78 \pm 0,06$

Os valores de atividade antioxidante encontrados das amostras (biomassa, SEHP e extratos secos) variaram entre 55,78 e 77,83%, sendo que os menores valores encontrados foram obtidos para os extratos secos preparados com temperatura de entrada de 175° C, estando provavelmente

relacionado com a redução da quantidade de carotenoides com o processo de secagem.

Conforme Gordon (1990), a ação antioxidante é baseada na quebra da cadeia do radical livre pela doação de um átomo de hidrogênio. Neste caso, acredita-se que os carotenoides, incluindo a astaxantina, presente nos extratos de, ao radical livre, átomos de hidrogênio dos grupos hidroxilas fenólicos. A atividade antioxidante da astaxantina tem sido mostrada em diversos estudos. Em alguns casos, a astaxantina demonstrou habilidade maior para combater radicais livres que àquela realizada pelo β -caroteno e pela vitamina E (NAGUIB, 2000). A forte propriedade antioxidante da astaxantina é devida à sua estrutura especial, com um total de onze duplas ligações conjugadas carbono-carbono (SHIMIDZU, GOTO, MIKI, 1996). Acredita-se que a atividade antioxidante da astaxantina, esteja relacionada a outras propriedades, como a proteção contra os raios luminosos ultravioleta (UV), fotoxidação, inflamação, anticarcinogênico, promoção da resposta imune, saúde do coração, olhos e próstata (GUERIN, 2003).

A secagem por atomização é um processo altamente adequado para os componentes sensíveis ao calor, tais como os carotenoides, e tem sido aplicada com sucesso para a manutenção da estabilidade dos carotenoides em alimentos vegetais, como cenoura, polpa de tomate, *blueberry*, entre

outros (KHA, NGUYEN, ROACH, 2010). Em resumo, os resultados encontrados neste trabalho considerando a atividade antioxidante dos extratos secos de *H. pluvialis* obtidos por *spray-drying*, corroboram os resultados de outros autores. Cerón, et al. (2007) demonstraram que a atividade antioxidante da *Haematococcus pluvialis* está relacionada com o conteúdo de carotenoides presentes.

6. CONCLUSÕES

- Os valores de rendimento de secagem variaram entre 87,8 e 94,6%, sendo que foram maiores quando a maior temperatura de secagem foi utilizada. A análise estatística evidenciou que o rendimento é afetado unicamente pela temperatura de entrada do *spray-dryer* ($P < 0,001$), mas não pela concentração de Aerosil®.

- Neste estudo, não foram observadas diferenças na morfologia das partículas quando as diferentes condições de secagem foram testadas, sugerindo que nem a temperatura de entrada, nem a concentração de dióxido de silício coloidal provocou mudanças nas características do líquido de alimentação e/ou no processo de secagem que resultassem em alterações na estrutura das partículas.

- Os valores de densidade aparente e compactada não parecem ter sido afetados pelas condições de secagem testadas. O índice de Carr e o fator de *Hausner* dos extratos secos também evidenciam que estes apresentam boas propriedades de fluxo.

- A análise estatística evidenciou que tanto a temperatura como a concentração de aerosil afetaram significativamente o teor de carotenoides totais nos extratos secos ($P=0,05$). O extrato ES1 apresentou maior concentração de carotenoides totais além da maior recuperação do teor em relação à solução extrativa. Observou-se que com o aumento da

temperatura e concentração do adjuvante de secagem proporcionou redução significativa do teor de carotenoides totais. A perda de apenas uma parte dos carotenoides pode provavelmente ser explicada pelo fato de que a sensibilidade à temperatura de carotenoides depende da estrutura química específica dos mesmos.

- Os valores de teor de astaxantina variaram entre 76,60 e 24,94 mg/100 g de extrato seco. A análise estatística revelou que ambos parâmetros de secagem afetaram significativamente o teor de astaxantina ($P = 0,05$). Para todos os extratos, os valores de recuperação foram baixos, variando entre 13,44 e 34,40%, mostrando que a astaxantina livre é afetada na secagem por *spray-drying*.

- O percentual dissolvido acumulado de carotenoides totais após 20 minutos de ensaio variou de 90,35% a 95,06%. A análise da variância revelou a ausência de diferença significativa entre os valores de eficiência de dissolução para um nível de significância de 5.

- Os valores de atividade antioxidante encontrados das amostras (Biomassa, SEHP e extratos secos) variaram entre 55,78 e 77,83%, sendo que os menores valores encontrados foram obtidos para os extratos secos preparados com temperatura de entrada de 175° C, estando provavelmente

relacionado com a redução da quantidade de carotenoides com o processo de secagem.

- Assim, o conjunto de resultados demonstrou que a obtenção de extratos secos a partir da biomassa de *Haematococcus pluvialis* pela técnica de secagem em torre de aspersão (*spray dryer*) é promissor especialmente, o extrato ES1, que apresentou maior teor de carotenoides totais, teor de astaxantina e maior atividade antioxidante.

- Como perspectivas futuras, espera-se testar a atividade anti-tumoral e anti-inflamatória *in vitro* e *in vivo* dos extratos.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERENCIAS

ABALDE, J. et al. **Microalgas: Cultivo y Aplicaciones**. Servicio de Publicacions, Universidade da Coruna, 1995. 210 p.

AKKAYA, Z.; SCHRÖDER, J.; TAVMAN, S.; KUMCUOGLU, S.; SCHUCHMANN, H. P.; GAUKEL, V. Effects of *Spray Drying* on Physical Properties, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity of Carob Molasses. **Int. J. Food Eng.** v. 8, n. 4, p. 1556-3758, Oct 2012.

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. L.; PERISSUTTI, B.; RODRIGUEZ, L. Effect of Aerosil on the properties of lipid controlled release microparticles. **J. Control. Release.** v.24, n.2, p. 233-246, 2004.

AMBIKE, A.A.; MAHADIK, K.R.; PARADKAR, A. Spray-dried amorphous solid dispersions of simvastatin, a low Tg drug: in vitro and in vivo evaluations. **Pharm. Res.** v.22, n.6, p.990–998, Jun 2005.

AMBROSIO, C.L.B.; CAMPOS, F.A.C.; FARO, Z.P. Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. **Revista de Nutrição**, v.19, n.2, p. 233-243, 2006.

ARAD, S.; RICHMOND, A. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products—major industrial species. *Porphyridium* spp. **Handbook of microalgal culture. Biotechnology and applied phycology**. Oxford, U.K.: Blackwell Science. p 289–97, 2004.

ARARUNA, S.M. Desenvolvimento e padronização (HPLC-DAD) do extrato seco por *spray dryer* de *Amburana cearensis* A.C. Smith (Cumarú). Dissertação submetida ao Programa de

Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do ceará, Fortaleza, 2008, 125 pág.

AUGUSTI, P.R.; QUATRIN, A.; SOMACAL, S.; CONTERATO, G.M.; SOBIESKI, R.; RUVIARO, A.R.; MAURER, L.H.; DUARTE, M.M.; ROEHRS, M.; EMANUELLI, T. Astaxanthin prevents changes in the activities of thioredoxin reductase and paraoxonase in hypercholesterolemic rabbits. **J. Clin. Biochem. Nutr.** v. 51, n. 1, p. 42–49, Jul 2012.

AULTON, Michael E. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BAI, SK.; LEE, SJ.; NA, HJ.; HA, KS.; HAN, JA.; LEE, H.; KWON, YG.; CHUNG, CK.; KIM, YM. Beta-Carotene inhibits inflammatory gene expression in lipopolysaccharide-stimulated macrophages by suppressing redox-based NF-kappaB activation. **Exp Mol Med.** v.31, n.4, p.323-34, Aug 2005.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; HOWES, T. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. **Drying Technology.** v. 15, n. 2, p. 671-684, 1997.

BOROWITZKA, MA.; JOHN M.; HUISMAN, JM.; OSBORN, A. Culture of theastaxanthin-producing green alga *Haematococcus pluvialis*: Effects of nutrients on growth and cell type. **Journal of Applied Phycology.** v. 3, n. 4, Dec 1991.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, Diário Oficial da União, 02/06/2003.

BRITTON, G. Structure and properties of carotenoids in relation to function. **The Easer Journal.** v. 9, p. 1551-8, 1995.

BROADHEAD, J.; ROUAN, S.K.; RHODES, C.T. The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Dev. Ind. Pharm.** v.18, p.1169–1206, 1992.

CADENAS E.; PACKER L. **Handbook of Antioxidants**, 2nd edition. Marcel Dekker Inc., New York, 2002.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray drying technique. I: hardware and process parameters. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.99, p.575–586, 2010.

CAMERA, E.; MASTROFRANCESCO, A.; FABBRI, C.; DAUBRAWA, F.; PICARDO, M.; SIES, H.; Stahl, W. Astaxanthin, canthaxanthin and b-carotene differently affect UVA-induced oxidative damage and expression of oxidative stress-responsive enzymes. **Experimental Dermatology**. v.18, p.222–231, 2008.

CAO, X.Q.; VASSEN, R.; SCHWARTZ, S.; JUNGEN, W.; TIETZ, F.; STÖEVER, D. Spray-drying of ceramics for plasma-spray coating. **J Eur Ceram Soc**. v.20, p. 2433-2439, 2000.

CERÓN, M.C.; GARCÍA-MALEA, M.C.; RIVAS, J.; ACIEN, F.G.; FERNANDEZ, J.M.; DEL RÍO, E.; GUERRERO, M.G.; MOLINA, E. Antioxidant activity of *Haematococcus pluvialis* cells grown in continuous culture as a function of their carotenoid and fatty acid content. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.74, n.5, p.1112-9, Apr 2007.

CERÓN-GARCÍA , C.; CAMPOS-PÉREZ, I.; MACÍAS-SÁNCHEZ, MD.; BERMEJO-ROMÁN, R.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, JM.; MOLINA-GRIMA, E. Stability of carotenoids in *Scenedesmus almeriensis* biomass and extracts under various storage conditions. **J Agric Food Chem**. v.9, n.11, p.6944-50, Jun 2010.

CHAN, L.W.; TAN, L.H.; HENG, P.W. Process analytical technology: application to particle sizing in spray drying. **AAPS PharmSciTech**. v.9, n.1, p.259-66, 2007.

CHEGINI, G. R.; GHOBADIAN, B. Effect of spray-drying conditions on physical properties of orange juice powder. **Drying Technology**. v.23, n.3, p.657-668, 2005.

CHEN, B. H.; TANG, Y. C. Processing and Stability of Carotenoid Powder from Carrot Pulp Waste. **J. Agric. Food Chem.** v.46, p.2312–2318, 1998.

CHEN, J.; SHI, J.; MACNAUGHTON, L.; et al. The scavenging capacity of combinations of lycopene, β -carotene, vitamin E, and vitamin C on the free radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). **J. Food Biochem.**, v. 33, p. 232-245, 2009.

CHORILLI, M.; SOUZA, A.A.; CORRÊA, F.; SALGADO, H.R.N. Estudo de perfil de dissolução dos medicamentos de referência, genérico e similar contendo cefalexina na forma farmacêutica cápsula. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v.31, n.1, p.69-73, 2010.

CORDERO, B.; OTERO, A.; PATINO, M.; ARREDONDO, B. O.; FABREGAS, J. Astaxanthin Production from the Green Alga *Haematococcus pluvialis* with Different Stress Conditions. **Biotechnology Letters**. v. 18, n. 2, p. 213-218, Feb 1996.

D'SOUZA, M.C.; SINGHA, S.; INGLE, M. Lycopene concentration of tomato fruit can be estimated from chromaticity values. **HortScience**. v.27, p.465–466, 1992.

DA SILVA L.; COUTO, R.; BRESOLIN, T. M. B. Medicinal Plants and Pharmaceutical Technology, in Plant Bioactives and Drug Discovery: Principles, Practice, and Perspectives (ed V. Cechinel-Filho), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2012.

DE PAULA, I. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato seco nebulizado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Compositae* (Marcela).**

Porto Alegre, 1996. 194p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DEL VALLE, JM.; DE LA FUENTE, JC. Supercritical CO₂ extraction of oilseeds: Review of kinetic and equilibrium models. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v.46, n.2, p.131-60, 2006.

DERNER, R.B. Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muelleri* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados. 2006. 158f. Tese de doutorado em Ciência dos Alimentos, UFSC, Florianópolis.

DOMINGUES, G.S.; GUTERRES, S.S.; BECKY, R.C.; POHLMANN, A. Micropartículas nanorevestidas contendo um fármaco modelo hidrofóbico: preparação em etapa única e caracterização biofarmacêutica. **Quim. Nova.** v.31, n.8, p.1966-1972, 2008.

DONG, Q.; ZHAO, XM. In situ carbon dioxide fixation in the process of natural astaxanthin production by a mixed culture of *Haematococcus pluvialis* and *Phaffia rhodozyma*. **Catalysis Today.** v. 98, n.4, p. 537–544, 2004.

ERSUS, S.; YURDAGEL, U. Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray dryer. **Journal of Food Engineering.** v.80, n.3, p.805–812, 2007.

FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FASSETT, RG.; COOMBES, JS. Astaxanthin in cardiovascular health and disease. **Molecules.** v.20, n.17, p.2030-48, Feb 2012.

GHIGGI, V. **Estudo do crescimento e indução da produção do pigmento astaxantantina por *Haematococcus pluvialis*.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade

Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GONZALEZ, MS. La astaxantina y su biossíntesis. **Contactos**, v. 36, p. 61-64, 2000.

GONZÁLEZ, S.; ASTNER, S.; AN, W.; GOUKASSIAN, D.; PATHAK, MA. Dietary lutein/zeaxanthin decreases ultraviolet B-induced epidermal hyperproliferation and acute inflammation in hairless mice. **J Invest Dermatol**. v.121, n.2, p.399-405, Aug 2003.

GORDON, M. F. The mechanism of antioxidant action in vitro. **Food Antioxidants**; Hudson, B. J. F., London, U. K., Eds.; Elsevier Applied Science: New York, p. 1-18, 1990.

GOTO, S.; KOGURE, K.; ABE, K.; KIMATA, Y.; KITAHAMA, K.; YAMASHITA, E.; TERADA, H. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. **Biochim Biophys Acta**. v.6, n.2, p.251-8, Jun 2001.

GUO, A.; BEDDOW, J.K.; VETTER, A.F. A Simple Relationship between particle size shape effects and density, flow rate and hausner ratio. **Power Technology**, v. 43, p. 279 – 284, 2005.

GOULA, A.M., ADAMOPOULOS, K.G. Stability of lycopene during spray drying of tomato pulp. **Food Science and Technology**. v.38, n.5, p.479–487, 2005.

GUEDES, AC.; AMARO, HM.; MALCATA, FX. Microalgae as sources of carotenoids. **Mar Drugs**. v.9, n.4, p.625-44, May-Jun 2011.

GUERIN, M.; HUNTLEY, M.E.; OLAIZOLA, M. *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. **Trends Biotechnol**. v.21, p.210–216, 2003.

HAEGELE, AD.; GILLETE, C.; O'NEIL, C.; WOLF, P.; HEIMENDIGER, J.; SEDLACEK, S. Plasma xanthophylls carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v.9, n.4, p. 421-425, Apr 2000.

HAEGELE, AD.; GILLETTE, C.; O'NEILL, C.; WOLFE, P.; HEIMENDINGER, J.; SEDLACEK, S.; THOMPSON, J. Plasma xanthophyll carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v.9, p.421-425, Apr 2000.

HAK, AE.; MA, J.; POWELL, CB.; CAMPOS, H.; GAZIANO, JM.; WILLETT, WC.; STAMPFER, MJ. Prospective study of plasma carotenoids and tocopherols in relation to risk of ischemic stroke. **Stroke.** v.35, n.7, p. 1584-8, Jul 2004.

HENRIQUES, NM.; NAVALHO, JC.; VARELA, JC.; CANCELA, ML. *Dunaliella*: uma fonte natural de beta-caroteno com potencialidades de aproveitamento biotecnológico. **Boletim de Biotecnologia**, n.61, p.12-18, Dez 1998.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F.M. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. **Rev. Food Sci. Nutr.** v.46, p.185-196, 2006.

HIRVONEN, T.; VIRTAMO, J.; KORHONEN, P.; ALBANES, D.; PIETINEN, P. Intake of flavonoids, carotenoids, vitamins C and E, and risk of stroke in male smokers. **Stroke.** v.31, n.10, p.2301-6, Oct 2000.

HUI, N.; HE, G-Q; RUAN, H.; CHEN, Q-H; CHEN, F. Application of derivative ratio spectrophotometry for determination of β -carotene and astaxanthin from *Phaffia*

rhodozyma extract. **Journal of Zhejiang University Science.** v.6, n.6, p. 514-522, Jun 2005.

HUSSEIN, G.; NAKAMURA, M.; ZHAO, Q.; IGUCHI, T.; GOTO, H.; SANKAWA, U.; WATANABE, H. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. **Biol Pharm Bull.** v.28, n.1, p.47-52, Jan 2005.

HUSSEIN, G.; SANKAWA, U.; GOTO, H.; MATSUMOTO, K.; WATANABE, H. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. **J. Nat. Prod.** v.69, p.443-449, Mar 2006.

IMAMOGLU, E.; SUKAN, FV.; DALAY, MC. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of *Haematococcus pluvialis*. **International Jorنال of Natural and Engineering Sciences.** v. 1, n.3, p. 05-09, 2007.

IRIBARREN, C.; FOLSOM, AR.; JACOBS, DR.; GROSS, MD.; BELCHER, JD.; ECKFELDT, JH. Association of serum vitamin levels, LDL susceptibility to oxidation, and autoantibodies against MDA-LDL with carotid atherosclerosis. A case-control study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** v.17, n.6, p.1171-7, Jun 1997.

IWAMOTO, T.; HOSODA, K.; HIRANO, R.; KURATA, H.; MATSUMOTO, A.; MIKI, W.; KAMIYAMA, M.; ITAKURA, H.; YAMAMOTO, S.; KONDO, K. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. **J Atheroscler Thromb.** v.7, n.4, p.216-22, 2000.

IZUMI-NAGAI, K.; NAGAI, N.; OHGAMI, K.; SATOFUKA, S.; OZAWA, Y.; TSUBOTA, K.; UMEZAWA, K.; OHNO, S.; OIKE, Y.; ISHIDA, S. Macular pigment lutein is antiinflammatory in preventing choroidal neovascularization, **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** v.27, n.12, p. 2555-2562, Dec 2007.

JACOBSSON, L.S.; YUAN, X.M.; ZIEDÉN, B.; OLSSON, A.G. Effects of alpha-tocopherol and astaxanthin on LDL oxidation and atherosclerosis in WHHL rabbits. **Atherosclerosis**. v.173, n.2, p.231-7, Apr 2004.

JIN, XH.; OHGAMI, K.; SHIRATORI, K.; SUZUKI, Y.; HIRANO, T.; KOYAMA, Y.; YOSHIDA, K.; ILIEVA, I.; ISEKI, K.; OHNO, S. Inhibitory effects of lutein on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.47, n.12, p.2562–2568, Jun 2006.

JOHANSEN, J.S.; HARRIS, A.K.; RYCHLY, D.J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. **Cardiovasc Diabetol**. v.29, n.1, p.5, Apr 2005.

KHA, T.C.; NGUYEN, M.H.; ROACH, PD. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. **Journal of Food Engineering**. v. 98, n. 3, p.385–392, 2010.

KIDD, P. Astaxanthin, cell membrane nutrient with diverse clinical benefits and anti-aging potential. **Altern. Med. Rev.** v.16, p.355–364, Dec 2011.

KIM, KN.; HEO, SJ.; YOON, WJ.; KANG, SM.; AHN, G.; YI, TH.; JEON, YJ. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF-kappaB and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. **Eur J Pharmacol**. v.649, n.1-3, p. 369–375, Dec 2010.

KIM, L.; RAO, A.V.; RAO, L.G. Lycopene II—Effect on osteoblasts: the carotenoid lycopene stimulates cell proliferation and alkaline phosphatase activity of SaOS-2 cells. **J Med Food**. v.6, n.2, p.79–86, 2003.

KLIPSTEIN-GROBUSCH, K.; GELEIJNSE, JM.; DEN BREEIJEN, JH, et al. Dietary antioxidants and risk of myocardial infarction in the elderly: the Rotterdam Study. **Am J Clin Nutr.** v.69, n.3, p.261–6, 1999.

KONISHI, I.; HOSOKAWA, M.; SASHIMA, T.; MAOKA, T.; MIYASHITA, K. Suppressive effects of alloxanthin and diatoxanthin from *Halocynthia roretzi* on LPS-induced expression of pro-inflammatory genes in RAW264.7 cells. **J. Oleo Sci.** v.57, n. 3, p.181–189, 2008.

KRINSKY, NI.; JOHNSON, EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Mol Aspects Med.** v.26, n.6, p. 459–516, Nov 2005.

KRITCHEVSKY, SB.; TELL, GS.; SHIMAKAWA, T.; DENNIS, B.; LI, R.; KOHLMEIER, L.; STEERE, E.; HEISS, G. Provitamin A carotenoid intake and carotid artery plaques: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. **Am J Clin Nutr.** v.68, n.6, p.726 –33, Sep 1998.

KUPCINSKAS, L.; LAFOLIE, P.; LIGNELL, A.; KIUDELIS, G.; JONAITIS, L.; ADAMONIS, K.; ANDERSEN, L.P.; WADSTRÖM, T. Efficacy of the natural antioxidant astaxanthin in the treatment of functional dyspepsia in patients with or without *Helicobacter pylori* infection: A prospective, randomized, double blind, and placebo-controlled study. **Phytomedicine.** v.15, n.6-7, p.391-9, Jun 2008.

KURASHIGE, M.; OKIMASU, E.; INOUE, M.; UTSUMI, K. Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. **Physiol Chem Phys Med NMR.** v.22, n.1, p.27-38, 1990.

LANNES, S. C.; MEDEIROS, M.L. Processamento de achocolatado de cupuaçu por *spray-dryer*. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 39, n. 1, Mar 2003.

LEACH, G.; OLIVEIRA, G.; MORAIS, R. Spray-drying of *Dunaliella salina* to produce a β -carotene rich powder. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 20, n. 2, p. 82-85, Feb 1998.

LEE, S.J.; BAI, S.K.; LEE, K.S.; NAMKOONG, S.; NA, H.J.; HA, K.S.; HAN, J.A.; YIM, S.V.; CHANG, K.; KWON, Y.G.; LEE, S.K.; KIM, Y.M. Astaxanthin inhibits nitric oxide production and inflammatory gene expression by suppressing I (κ) B kinase-dependent NF- κ B activation. **Mol Cells**. v.31, n.1, p.97-105, Aug 2003.

LEMOS-SENNA, E.M.T.; PRETOVICK, P.R.; GONZÁLES ORTEGA, G.; BASSANI, V.L. preparation and characterization of spray dryer powders from *Achyrocline satureioides* (Lam) DC extracts. *Phytotherapy Research*. v.11, p. 133-127, 1997.

LI, S.Y.; FU, Z.J.; LO, A.C. Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy. **Oxid Med Cell Longev**. 2012:426769, 2012.

LORENZ, R.T.; CYSEWSKI, G.R. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. **Trends in Biotechnology**. v. 18, n. 4, p. 160-167, Abr 2000.

LOURENÇO, S.O. Cultivo de Microalgas Marinhas: Princípios e Aplicações. RiMa, São Carlos, 606 páginas, 2006.

MACKINNON, E.S.; RAO, A.V.; JOSSE, R.G.; RAO, L.G. Supplementation with the antioxidant lycopene significantly decreases oxidative stress parameters and the bone resorption marker N-telopeptide of type I collagen in postmenopausal women. **Osteoporos Int**. v.22, n.4, p.1091-101, Apr 2011.

MAGGIO, D.; POLIDORI, M.C.; BARABANI, M.; TUFI, A.; RUGGIERO, C.; CECCHETTI, R.; AISA, M.C.; STAHL, W.; CHERUBINI, A. Low levels of carotenoids and retinol in involutional osteoporosis. **Bone**. v.38, p.244-248, Sep 2006.

MAIO, R., BERTO, J. C., CORRÊA, C., CAMPANA, A. O., PAIVA, S. A. R. Ingestão Dietética, Concentrações Séricas e Teciduais Orais de Carotenoides em Pacientes com Carcinoma Epidermoide da Cavidade Oral e da Orofaringe. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 56, n. 1, p. 7-15, 2010.

MANABE, E.; HANDA, O.; NAITO, Y.; MIZUSHIMA, K.; AKAGIRI, S.; ADACHI, S.; TAKAGI, T.; KOKURA, S.; MAOKA, T.; YOSHIKAWA, T. Astaxanthin protects mesangial cells from hyperglycemia-induced oxidative signaling. **J Cell Biochem.** v.103, n.6, p.1925–37, Apr 2008.

MARGALITH, P. Production of ketocarotenoids by microalgae. **Appl Microbiol Biotechnol.** v.51, p.431–438, 1999.

MARTINS, R.M.; PEREIRA, S.V.; MACHADO, M.O. Preparation of microparticles of hydrochlorthiazide by spray drying. In: **European Drying Conference** – Euro Drying, 2011.

MASTERS, K. **Spray Drying Handbook**. 4ed. New York: John Miley, 1985. 696p.

MECOCCI, P.; POLIDORI, MC.; INGEGNI, T.; CHERUBINI, A.; MATTIOLI, P.; CATANI, M. RINALDI, P.; CECCHETTI, R.; STAHL, W.; SENIN, U.; BEAL, MF. Lymphocyte oxidative DNA damage and plasma antioxidants in Alzheimer disease. **Arch. Neurol.** v.59, p.794– 798, May 2002.

MENDONÇA, T. A., CAZUMBÁ, I., LIMA, A. O., NUNES, I. L. Prospecção tecnológica da utilização de microalgas em processo de extração de carotenoides voltados para insumos na nutrição humana e animal. *Revista Geintec*, v. 3, n. 5, p. 193-204, 2013.

MENDONÇA, T.C.; CAZUMBÁ, I.; LIMA, A.O.; NUNES, I.T. technological forecasting of the use in process of

microalgae extraction of carotenoids aimed for supplies in nutrition and feed. **GEINTEC**. v. 3, n. 5, p.193-204, 2013.

MEZZOMO, N.; MAESTRI, B.; DOS SANTOS, R.L.; MARASCHIN, M.; FERREIRA, S.R. Pink shrimp (*P. brasiliensis* and *P. paulensis*) residue: influence of extraction method on carotenoid concentration. **Talanta**. v.15, n.3, p.1383-91, Sep 2011.

MIKI, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. **Pure Appl Chem**. v.63, p.141–146, 1991.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakrin J Sci Technol**. v.26, p. 211–216, 2004

MONROY-RUIZ, J.; SEVILLA, M.A.; CARRÓN, R.; MONTERO, M.J. Astaxanthin-enriched-diet reduces blood pressure and improves cardiovascular parameters in spontaneously hypertensive rats. **Pharmacol Res**. v.63, n.1, p.44-50, Jan 2011.

MORRIS, DL.; KRITCHEVSKY, SB.; DAVIS, CE. Serum carotenoids and coronary heart disease. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial and Follow-up Study. **JAMA**. v.272, n.18, p.1439–41, Nov.1994.

NAGUIB YM. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **J Agric Food Chem**. v.48, n.4, p.1150-1154, Apr 2000.

NAGUIB, Y.M.A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **J. Agric. Food Chem**. v. 48, p.1150–1154, Apr 2000.

NAKAO, R.; NELSON, O.L.; PARK, J.S.; MATHISON, B.D.; THOMPSON, P.A.; CHEW, P. Effect of Astaxanthin Supplementation on Inflammation and Cardiac Function in

BALB/c Mice. **Anticancer Research**. v.30, p. 2721-2726, Jul 2010.

NIJDAM, J. J.; LANGRISH, T. A. J. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**. v. 77, n. 4, p. 919-925, Dec 2006.

ODEBERG, JM.; LIGNELL, A.; PETTERSSON, A. ; et al. Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in human is enhanced by incorporation of lipid based formulations. **Eur. J. Pharmac. Sci.**, v. 19, p. 299-304, Jul 2003.

OHGAMI, K.; SHIRATORI, K.; KOTAKE, S.; NISHIDA, T.; MIZUKI, N.; YAZAWA, K.; OHNO, S. Effects of astaxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. v.44, n.6, p.2694-701, Feb 2003.

OKADA, Y.; ISHIKURA, M.; MAOKA, T. Bioavailability of astaxanthin in *Haematococcus* algal extract: the effects of timing of diet and smoking habits. **Biosci Biotechnol Biochem**. v.73, n.9, p.1928-32, Sep 2009.

OLAIZOLA M. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. **Biomol Eng**. v.20, n. 4-6, p.459-66, Jul 2003.

OLIVEIRA, OW.; PETROVICK, PR. Secagem por aspersão (*spray drying*) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v.20, n.4, p.641-650, Ago/Set 2010.

OLSON, JA. Absorption, transport, and metabolism of carotenoids in human. **Pure Appl. Chem**. v. 66, p. 1011-1116, 1994.

ØSTERLIE, M.; BJERKENG, B.; LIAAEN-JENSEN, S. Plasma appearance and distribution of astaxanthin E/Z and R/S

isomers in plasma lipoproteins of men after single dose administration of astaxanthin. **J Nutr Biochem.** v.11, n.10, p.482-90, Oct 2000.

PALOZZA, P.; KRINSKY, N.I. Antioxidant effects of carotenoid in vivo and in vitro: An overview. **Methods Enzymol.** v. 213, p.403-420, 1992.

PANGESTUTI, R.; VO, TS.; NGO, DH.; KIM, SK. Fucoxanthin ameliorates inflammation and oxidative reponses in microglia. **J Agric Food Chem.** v.24, n.16, p.3876-83, Apr 2013.

PARISI, V.; TEDESCHI, M.; GALLINARO, G.; VARANO, M.; SAVIANO, S.; PIERMAROCCHI, S. Carotenoids and antioxidants in age-related maculopathy italian study: multifocal electroretinogram modifications after 1 year. **Ophthalmology.** v.115, n.2, p.324-333, Feb 2008.

PASHKOW, FJ.; WATUMULL, DG.; CAMPBELL, CL. Astaxanthin: a novel potential treatment for oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. **Am J Cardiol.** v.22, n.10, p.58-68, May 2008.

PASSOS, R.; MORIEL, D.G.; LAGREZE, F.; GOUVEIA, L.; MARASCHIN, M. Fontes naturais de carotenoides de interesse para a aquicultura: análise comparativa da eficiência de métodos de extração. **Rev. Bras. Enga. Pesca.** v.2, n.1, p.103-113, jan 2007.

PATEL, B.B.; PATEL, J.C.; CHAKRABORTYB, S.; SHUKLAD, D. Revealing facts behind spray dried solid dispersion technology used for solubility enhancement. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2014.

POLIDORI, MC. Antioxidant micronutrients in the prevention of age-related diseases. **J Postgrad Med.** v.49, p.229–235, Jul-Sep 2003

PRIYADARSHANI, I.; BISWAJIT, R. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **J Algal Biomass Utln.** v.3, n.4, p. 89–100, 2012.

PROMISLOW, J.H.E.; GOODMAN-GRUEN, D.; SLYMEN, D.J.; BARRET-CONNOR, E. Retinol intake and bone mineral density in the elderly: The Rancho Bernardo Study. **J Bone Miner Res.** v.17, p.1349-1358, Aug 2002.

QUEK, S.Y.; CHOK, N.K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing.** v.46; n.5; p. 386–392, May 2007.

RAO, AV.; AGARWAL, S. Effect of diet and smoking on serum lycopene and lipid peroxidation. **Nutr Res.** n.18, p.713–21, 1998.

RAO, L.G.; KRISHNADEV, N.; BANASIKOWSKA, K.; RAO, A.V. Lycopene effects on osteoclasts: lycopene inhibits basal and parathyroid hormone-stimulated osteoclast formation and mineral resorption mediated by reactive oxygen species in rat bone marrow cultures. **J Med Food.** v.6, p.69-78, 2003.

RAO, L.G.; MACKINNON, E.S.; JOSSE, R.G.; MURRAY, T.M.; STRAUSS, A.; RAO, A.V. Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausal women. **Osteoporosis Int.** v.18, n.1, p.109–15, Jan 2007.

RAPOSO, MF.; MORAIS, AM.; MORAIS, RM. Effects of spray-drying and storage on astaxanthin content of *Haematococcus pluvialis* biomass. **World J Microbiol Biotechnol.** v.28, n.3, p.1253-7, Mar 2012.

RISO, P.; BRUSAMOLINO, A.; CIAPPELLANO, S.; PORRINI, M. Comparison of lutein bioavailability from vegetables and supplement. **Int J Vitam Nutr Res.** v.73, n.3, p.201-5, May 2003.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M.; GODOY, H.T.; AMAYA-FARFAN, J. Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **J. Food Compos. Anal.** v.21, p.445-463, 2008.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, G.R.; GONZÁLEZ-GARCÍA, R.; GRAJALES-LAGUNES, A.; RUIZ-CABRERA, M.A.; ABUD-ARCHILA, M. Spray-drying of cactus pear juice (*Opuntia streptacantha*): effect on the physicochemical properties of powder and reconstituted product. **Drying Technology**. v.23, n.4, p. 955–973, 2005.

RYCKEBOSCH, E.; MUYLAERT, K.; EECKHOUT, M.; RUYSSSEN, T.; FOUBERT, I. Influence of drying and storage on lipid and carotenoid stability of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **J Agric Food Chem.** v.26, n.20, p.11063-9, Oct 2011.

SALONEN, JT.; KORPELA, H.; SALONEN, R.; NYSSONEN, K.; YLAHERTTUALA, S. Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. **Lancet.** v.11, n.339, p.883-7, 1992.

SASAKI, Y.; KOBARA, N.; HIGASHINO, S.; GIDDINGS, J.C.; YAMAMOTO, J. Astaxanthin inhibits thrombosis in cerebral vessels of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Nutr Res.** v.31, n.10, p.784-9, Oct 2011.

SESSO, HD.; BURING, JE.; NORKUS, EP.; GAZIANO, JM. Plasma lycopene, other carotenoids, and retinol and the risk of cardiovascular disease in women. **Am J Clin Nutr.** v.79, n.1, p.47–53, Jan 2004.

SHARAPIN, N. Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos. Cyted, Santafé de Bogotá, p. 145-157, 2000.

SHARONI, Y.; DANILENKO, M.; DUBI, N.; BEN-DOR, A.; LEVY, J. Carotenoids and transcription. **Arch Biochem Biophys.** v.430, n.1, p.89-96, Oct 2004 .

SHEN, S.C.; NG, W.K.; CHIA, L. Physical state and dissolution of ibuprofen formulated by co-spray drying with mesoporous silica: effect of pore and particle size. **Int. J. Pharm.** v.410, p.188–195, May 2011.

SHIMIDZU, N.; GOTO, M.; MIKI, W. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. **Fisheries Science.** v.62, p.134–137, Aug 1996.

SHIMODA, H.; SHAN, S.J.; TANAKA, J.; MAOKA, T. β -Cryptoxanthin suppresses UVB-induced melanogenesis in mouse: involvement of the inhibition of prostaglandin E₂ and melanocyte-stimulating hormone pathways. **J Pharm Pharmacol.** v.64, n.8, p.1165-76, Aug 2012.

SILVA, V. M., SILVA, L. A., ANDRADE, J. B., VELOSO, M. C. C, SANTOS, G. V. Determination of moisture content and water activity in algae and fish by thermoanalytical techniques. *Quim. Nova*, v. 31, n. 4, p. 901-905, 2008.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 7^a ed. Rio de Janeiro: LTC Editora, 2006.

SOARES LAL, 2002. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek – *Celastraceae*. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final.** Porto Alegre, 285p. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

SOONTORNCHAIBOON, W.; JOO, SS.; KIM, SM. Anti-inflammatory effects of violaxanthin isolated from microalga *Chlorella ellipsoidea* in RAW 264.7 macrophages. **Biol. Pharm. Bull.** v. 35, n.7, p.1137–1144, 2012.

SPILLER, G.A.; DEWELL, A. Safety of an astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* algal extract: a randomized clinical trial. **J Med Food.** v.6, n.1, p.51-6, 2003.

STAHL, W.; HEINRICH, U.; JUNGSMANN, H.; SIES, H.; TRONNIER, H. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. **Am. J. Clin. Nutr.** v.71, p.795–798, Mar 2000.

STAHL, W.; NICOLAI, S.; BRIVIBA, K.; HANUSCH, M.; BROSZEIT, G.; PETERS, M.; MARTIN, H.D.; SIES, H. Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. **Carcinogenesis**. v.18, n.1, p.89-92, Jan 1997.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**. v.24, n.6, p. 345-51, Dec 2003.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochim Biophys Acta**. v.30, n.2, p.101-7, May 2005.

STREET, DA.; COMSTOCK, GW.; SALKELD, RM.; SCHUEP, W.; KLAG, MJ. Serum antioxidants and myocardial infarction. Are low levels of carotenoids and alpha-tocopherol risk factors for myocardial infarction? **Circulation**. v.90, n.3, p.1154–61, Nov 1994.

TAKEUCHI, H.; NAGIRA, S.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Solid dispersion particles of amorphous indomethacin with fine porous silica particles by using spray-drying method. **Int. J. Pharm.** v.293, p.155–164, Apr 2005.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E.B.; JUNYAPRASERT, V.B.; MÜLLER, R.H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q (10) - development, physicochemical characterization and in vitro release studies. **Eur J Pharm Biopharm.** v.67, n.1, p.141-8, 2007.

TERAZAWA, S.; NAKAJIMA, H.; SHINGO, M.; NIWANO, T.; IMOKAWA, G. Astaxanthin attenuates the UVB-induced

secretion of prostaglandin E₂ and interleukin-8 in human keratinocytes by interrupting MSK1 phosphorylation in a ROS depletion-independent manner. **Experimental Dermatology**. v.21, n.1, p.11–17, Jul 2012.

THE UNITED States Pharmacopeia 30. National Formulary 25: 2007. Rockville: U.S. Pharmacopeia, 2007.

TOMINAGA, K.; HONGO, N.; KARATO, M.; YAMASHITA, E. Cosmetic benefits of astaxanthin on humans subjects. **Acta Biochim Pol.** v. 59, n. 1, p.43–47, Mar 2012.

TROSKO, J.E.; CHANG, C.C. Modulation of cell-cell communication in the cause and chemoprevention/chemotherapy of cancer. **Biofactors**. v.12, .n1-4, p.259-63, 2000.

UCHIYAMA, K.; NAITO, Y.; HASEGAWA, G.; NAKAMURA, N.; TAKAHASHI, J.; YOSHIKAWA, T. Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. **Redox Rep.** v.7, n.5, p.290-3, 2002.

URIKURA, I.; SUGAWARA, T.; HIRATA, T. Protective effect of Fucoxanthin against UVB-induced skin photoaging in hairless mice. **Biosci Biotechnol Biochem.** v.75, n.4, p.757-60, Apr 2011.

VALENTE, B.R. (2010). Desenvolvimento de comprimidos de liberação entérica contendo omeprazol. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmácia, Florianópolis, 211p.

VAN DEN HOEK, C.; MANN, DG.; JAHNS, HM. **Algae. An Introduction to Phycology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995.

VASCONCELOS, E.A.F.; MEDEIROS, M.G.F.; RAFFIN, F.N.; MOURA, T.F.A.L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil® 200 nas características dos

extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (*Anacardiaceae*). **Rev Bras Farmacogn.** v.15, p.243-249, 2005.

VILLANOVA, J.C.O.; SÁ, V.R. **Excipientes: Guia prático para padronização**. Pharmabooks. São Paulo, 2007.

WANG, J.J.; CHEN, Z.Q.; LU, W.Q. Hypoglycemic effect of astaxanthin from shrimp waste in alloxan-induced diabetic mice. **Medicinal Chemistry Research.** v. 21, n. 9, p. 2363-2367, Sep 2012.

YAMAGUCHI, M.; UCHIYAMA, S. Effect of carotenoid on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissues *in vitro*: the unique anabolic effect of β -cryptoxanthin. **Biol Pharm Bull.** v.26, p.1188-1191, Aug 2003.

YAMAGUCHI, M.; UCHIYAMA, S. β -Cryptoxanthin stimulates bone formation and inhibits bone resorption in tissue culture *in vitro*. **Mol Cell Biochem.** v.258, p.137-144, Mar 2004.

YANG, Y.; KIM, B.; LEE, J.Y. Astaxanthin Structure, Metabolism, and Health Benefits. **J Hum Nutr Food Sci.** v.1, p. 1003, 2013.

YASUI, Y.; HOSOKAWA, M.; MIKAMI, N.; MIYASHITA, K.; TANAKA, T. Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines. **Chem Biol Interact.** v.193, n.1, p. 79–87, Aug 2011.

YONGMANITCHAI, W.; Ward, OP. Screening of algae for potential alternative sources of eicosapentanoic acid. **Phytochemistry.** v.30, p.2963-2967, 1992.

YOSHIHISA, Y.; REHMAN, MU.; SHIMIZU, T. Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, inhibits ultraviolet-induced apoptosis

in keratinocytes. **Exp Dermatol.** v.23, n.3, p.178-83, Mar 2014.

YUAN, J.P.; PENG, J.; YIN, K.; WANG, J.H. Potential health promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. **Mol. Nutr. Food Res.** v.55, p.150–165, 2011.

ZHANG, J.; SUN, Z.; SUN, P.; CHEN, T.; CHEN, F. Microalgal carotenoids: beneficial effects and potential in human health. **Food Funct.** v.5, n.3, p.413-25, Mar 2014.